

ORSAY
SERIE A
N° D'ORDRE
814

T H E S E

PRESENTEE

AU CENTRE D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS - SUD

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Behdjat SEDAGHAT

LA POPULATION DES MACROPHAGES INTRAALVEOLAIRES
DANS LE POUMON DU RAT :
ETUDES CYTOLOGIQUE ET CYTODYNAMIQUE
DANS DIFFERENTES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

Soutenue le 30 juin 1971, devant la Commission d'Examen

MM. BENOIT

Président

CHEVALLIER

HALPERN

Examineurs

MASSE

ORSAY
SERIE A
N° D'ORDRE
814

T H E S E

PRESENTEE

**AU CENTRE D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS - SUD**

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Behdjat SEDAGHAT

**LA POPULATION DES MACROPHAGES INTRAALVEOLAIRES
DANS LE POUMON DU RAT :
ETUDES CYTOLOGIQUE ET CYTODYNAMIQUE
DANS DIFFERENTES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES**

Soutenue le 30 juin 1971, devant la Commission d'Examen

MM. BENOIT

Président

CHEVALLIER

HALPERN

Examineurs

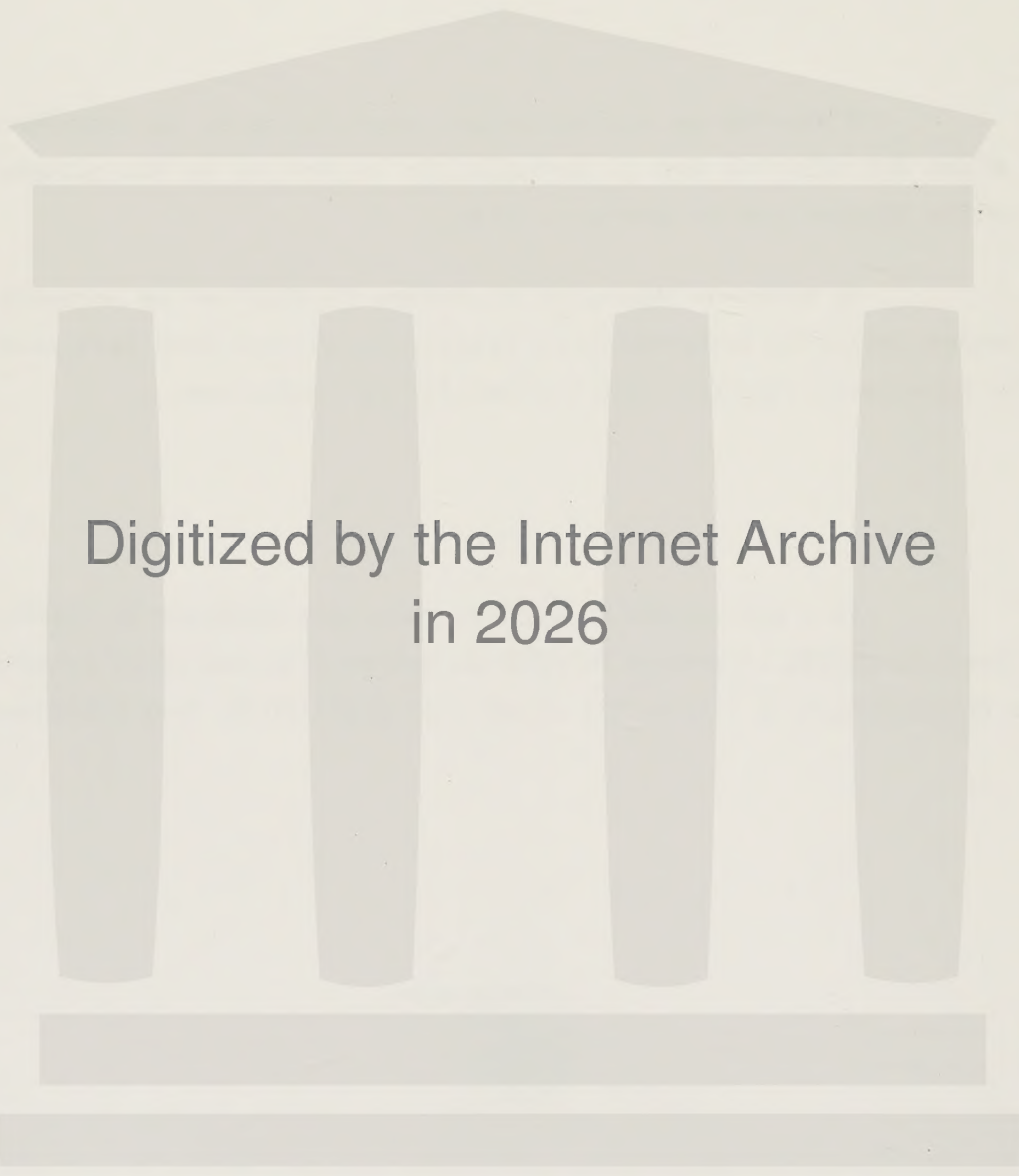
MASSE



J'exprime ma reconnaissance pour l'aide et la compréhension qui m'ont été offertes par le personnel de la Section de Toxicologie Nucléaire dirigée par le Docteur LAFUMA.

Je remercie Madame BEAU, Madame CUSSINET et le personnel de la Documentation du Département de Protection qui ont tout fait pour que cette thèse soit imprimée dans les meilleures conditions.

Il m'est agréable enfin de remercier Monsieur LE BOUFFANT, le Docteur MARTIN et Madame NORMAND du Centre d'Etudes et de Recherches des Charbonnages de France qui m'ont fait profiter de leur expérience.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550415_0023

Ce travail a été effectué dans les Laboratoires du Département
de Protection dirigé par le Docteur JAMMET

- . A Monsieur le Professeur BENOIT qui, avec beaucoup de bienveillance, a accepté la présidence de cette thèse
- . Je remercie le Professeur CHEVALLIER d'avoir bien voulu faire partie de ce Jury
- . J'exprime ici ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur HALPERN qui nous a fait le très grand honneur de juger ce travail.

Je remercie infiniment le Docteur MASSE qui m'a accueillie avec amitié dans ses laboratoires.

Par ses conseils et sa compétence il a facilité mon travail et la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à lui exprimer ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier également:

- . Monsieur GUENET, Docteur-Vétérinaire qui m'a permis de travailler sur animaux axéniques et m'a aidé de ses conseils,
- . Madame L'HULLIER, Technicienne au Commissariat à l'Energie Atomique qui m'a toujours aidé avec compétence et gentillesse.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION	1
II - HISTORIQUE	4
II.1 - La phagocytose intraalvéolaire	4
II.2 - Macrophages et tissu alvéolaire	5
II.3 - Origine des macrophages alvéolaires	7
II.3.1 - Macrophages et pneumocytes granuleux	8
II.3.2 - Macrophages et histiocytes de la paroi	8
II.3.3 - Origine extrapulmonaire des macrophages	9
II.3.3.1 - Origine lymphocytaire	10
II.3.3.2 - Origine monocytaire	12
II.4 - Durée de vie, migration, excrétion des macrophages alvéolaires	13
III - MATERIEL ET TECHNIQUES	17
III.1 - Les souches animales	17
III.2 - Les méthodes d'extraction cellulaire	17
III.3 - Prélèvement des échantillons	18
III.4 - Mesure de la synthèse d'ADN par les macrophages alvéolaires	23
III.5 - Techniques d'empoussiérage et de mise en aérosol	29
III.5.1 - Aérosol d'hématite	29
III.5.2 - Aérosol de plutonium	30
III.5.3 - Empoussiérage par la silice	30
III.6 - Méthodes de détermination de la courbe d'épuration alvéolaire	33
III.6.1 - Comptage des animaux	33
III.6.2 - Classement et utilisation des données	35
III.7 - Mesure de l'excrétion cellulaire par cathéterisme gastro-oesophagien	35
III.8 - Parabiontes	40
III.8.1 - Technique chirurgicale	40
III.8.2 - Contrôle de l'état de parabiose	40

IV - RESULTATS EXPERIMENTAUX	43
IV.1 - Etude comparée des différentes méthodes d'extraction cellulaire	43
IV.1.1 - Résultats	43
IV.1.2 - Discussion-conclusions	44
IV.2 - Nature des cellules extraites	45
IV.2.1 - Microscopie optique	45
IV.2.2 - Microscopie électronique	49
IV.3 - Etude de l'influence de la lignée, de l'état de contamination bactérienne, du sexe et de la saison, sur la population des macrophages alvéolaires	68
IV.3.1 - Résultats	68
IV.3.2 - Discussion - conclusions	70
IV.4 - Evaluation de la population alvéolaire totale chez le rat	72
IV.4.1 - Technique	72
IV.4.2 - Résultats	73
IV.4.3 - Discussion - conclusions	75
IV.5 - Excrétion des macrophages alvéolaires par remontée trachéale chez le rat	78
IV.5.1 - Méthodes de mesure	80
IV.5.1.1 - Par sondage gastrooesophagien	80
IV.5.1.2 - Par exploitation des courbes de décroissance	82
IV.5.2 - Résultats	82
IV.5.3 - Discussion - conclusions	82
IV.6 - Renouvellement des macrophages alvéolaires	85
IV.6.1 - Synthèse d'ADN par les macrophages de l'alvéole	85
IV.6.1.1.- Résultats	85
IV.6.1.2 - Discussion - conclusions	86
IV.6.2 - Durée de la phase S - conclusions	89
IV.6.3 - Migration des macrophages tissulaires vers le poumon	94
IV.6.3.1 - Méthode	95
IV.6.3.2 - Résultats	95
IV.6.3.3 - Discussion - conclusions	95

IV.7 - Adaptation de la population alvéolaire à l'agression = Intoxication par la silice et le plutonium-239	99
IV.7.1 - Résultats	99
IV.7.2 - Discussion - conclusion	101
IV.8 - Régulation humorale du renouvellement des macrophages alvéolaires	106
V - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	109
VI - BIBLIOGRAPHIE	111

I - INTRODUCTION

Depuis ASCHOFF les macrophages des tissus animaux ont été rassemblés dans une unité ontogénétique, et fonctionnelle : le système réticulo-endothélial. Si depuis 1924 [57] la notion d'origine Réticulo-Endothéliale a subi de nombreuses critiques, celle du système par contre est demeurée, liée vraisemblablement à l'importance du rôle de défense qu'ont attribué aux macrophages, METCHNIKOFF et les tenants de l'immunité cellulaire.

Les grandes cellules mononucléées intraalvéolaires du poumon, retrouvées chez la plupart des espèces animales terrestres évoluées, appartiennent incontestablement à ce système. Le nom de cellules à poussières qui leur a été donné, les nombreuses observations des pathologistes, témoignent de l'aptitude des macrophages alvéolaires à séquestrer les corps étrangers et à réagir aux irritations locales. Les recherches de laboratoire ont montré qu'elles étaient capables de digérer les composants de la matière vivante et qu'elles disposaient pour cela d'un équipement enzymatique comparable à celui des autres macrophages des tissus. Les recherches les plus récentes ont montré en outre qu'elles étaient capables de synthétiser des anticorps, de transférer certains caractères de l'immunité et qu'elles répondaient aux informations portées par les lymphocytes en modifiant leur activité bactériolytique [129].

Malgré ces caractères, le macrophage alvéolaire continue de susciter la curiosité de nombreux chercheurs qui lui accordent, comme à l'ostéoclaste, une place particulière parmi les phagocytes de l'organisme. Cette attitude n'est pas justifiée par des considérations morphologiques car des macrophages typiques comme les macrophages dendritiques de la rate ou les cellules de Küpffer du foie, s'écartent autant que la cellule alvéolaire du type cellulaire moyen que pourrait représenter le macrophage péritonéal. En fait le caractère distinctif tient à la spécialisation de la fonction exercée qui oppose nettement le macrophage alvéolaire aux cellules de Küpffer par exemple. En effet la situation privilégiée qu'occupent les macrophages du foie confère à ces derniers une activité antixénique prépondérante qui s'exerce, soit par colloïdopexie, soit par phagocytose, soit par pinocytose, et contribue à maintenir constantes les propriétés du milieu intérieur. Cette fonction n'apparaît pas clairement pour l'ostéoclaste dont l'activité semble limitée au remodellement osseux ; elle

n'apparaît pas non plus nettement pour le macrophage alvéolaire, car cette cellule ne se trouve pas au contact du milieu intérieur, mais au contact du milieu extérieur.

L'alvéole en effet est un diverticule du milieu extérieur. Il est revêtu d'un épithélium, au même titre que tous les tissus en contact avec ce milieu. Toutefois, contrairement à tous les épithéliums qui disposent de particularités mécaniques ou biochimiques propres à assurer la protection du milieu intérieur, cet épithélium alvéolaire ne constitue pas un revêtement d'isolement. Il apparaît tellement ténu, tellement adapté à sa fonction d'échangeur gazeux que cette adaptation s'est faite presque totalement aux dépens de la fonction antixénique. Sans doute, l'activité sécrétrice des pneumocytes granuleux peut-elle être comparée, comme cela a été suggéré, à celle des cellules à mucus, mais les propriétés des produits de sécrétion paraissent beaucoup moins bien adaptées que les mucines à l'isolement et au transport des corps étrangers. En fait, le milieu intérieur est pratiquement à nu et sa défense presque exclusivement assurée par les macrophages alvéolaires.

Ces cellules assurent ainsi un double rôle : d'une part, elles s'opposent à la dissémination des particules en suspension dans l'air inhalé, d'autre part elles éliminent les obstacles dressés sur la voie des transferts gazeux au travers de la mince lame cytoplasmique des pneumocytes membraneux. Les macrophages alvéolaires ont ainsi un rôle physiologique de défense. Ils l'assurent de manière fort complète puisqu'ils accompagnent les éléments qui ne peuvent être digérés jusqu'à ce qu'ils soient rejetés de l'organisme par remontée le long des voies aériennes.

Les conséquences de ce phénomène sur la population alvéolaire sont évidentes. A la disparition par sénescence des cellules, s'ajoute une fuite permanente, compensée ou non par l'arrivée de cellules nouvelles dans l'alvéole.

Le but du travail que nous présentons ici, est de caractériser la population des macrophages alvéolaires chez le rat normal. A cette fin nous nous proposons : de définir la population cellulaire impliquée dans l'immunité cellulaire non spécifique, de montrer l'adaptation de cette population à différentes conditions physiologiques et d'analyser les mécanismes par lesquels cette adaptation est possible.

Nous étudierons la dynamique de la population des macrophages dans les conditions physiologiques grâce à la mise au point des méthodes d'évaluation de la population alvéolaire totale, de l'excrétion quotidienne des cellules alvéolaires par remontée bronchique et de la vitesse de division des macrophages de l'alvéole. Par ailleurs, l'étude de la réaction du pcumon à différents types d'agressions sera analysée. Les conséquences sur la compréhension de l'épuration alvéolaire d'une part et de l'origine des macrophages alvéolaires d'autre part seront dégagées.

II - HISTORIQUE

II.1 - La phagocytose intraalvéolaire

L'identification et l'isolement conceptuel du macrophage alvéolaire, ou plutôt de la cellule alvéolaire capable de phagocytose, débutent après les travaux de METCHNIKOFF (1892) [145] sur l'immunité cellulaire.

Certes, avant la théorie phagocytaire, la présence de corps étrangers dans le poumon avait été remarquée et notamment par CHARCOT en 1887 [44] qui avait signalé des particules de grès dans les pneumonies chroniques. Certains travaux expérimentaux avaient même été entrepris :

SLAVJANSKY en 1869 [195] utilisant une technique très moderne de double marquage, avait montré après injection intraveineuse d'un colorant colloïdal accompagnée d'une injection intratrachéale d'un autre colorant, que des cellules contenant les deux marqueurs pouvaient être identifiées à l'intérieur de l'alvéole. En bien des points cette expérimentation devait inaugurer les recherches modernes sur l'origine du macrophage alvéolaire, sur la sécurité du marquage cytoplasmique cellulaire et sur le rôle excrétoire du poumon pour les particules étrangères non digérées par les macrophages des tissus.

Cependant, comme le faisait remarquer DELAUNAY (1970) [56] si des substances étrangères (et particulièrement des microbes) avaient été remarquées à l'intérieur de certaines cellules, la notion que ce phénomène correspondait à un mécanisme de défense, à une véritable immunité cellulaire, est due entièrement au génie de METCHNIKOFF (1884) [143], contre toute la tradition scientifique de son époque.

Partant de cette idée, BRISCOE (1908) [27] a montré que des cellules alvéolaires étaient capables de phagocyter des hématies, c'est-à-dire de les introduire dans leur cytoplasme et de les digérer.

Après SLAVJANSKY, WESTHUES (1922) [218] avec du carmin, SEEMAN (1927) [190] avec du bleu trypan, montraient les fonctions colloïdopexiques de ces cellules et leur analogie avec les autres phagocytes de l'organisme.

Bien des auteurs par la suite devaient s'intéresser aux mécanismes de défense de l'alvéole pulmonaire par les macrophages. Parmi les étapes les plus importantes, nous signalerons les observations de CESA-BIANCHI (1913) [41] qui, frappé par les relations entre anthracose et tuberculose, émet l'hypothèse que la fixation des poussières par les macrophages contribue à une diminution de l'immunité cellulaire, favorable au développement du bacille de Koch. Ces obser-

vations n'ont rien perdu de leur actualité et les travaux les plus récents de GREEN (1969) [80] RYLANDER (1968) [181] GUARNERI, LAURENZI (1968) [84] utilisent les tests de viabilité bactérienne comme témoignage de l'intégrité de la fonction antixénique dans le poumon.

PERMAR (1920) [161], pour sa part, montre que l'introduction de particules étrangères se traduit par une augmentation des cellules libres de l'alvéole. L'étude de l'homéostasie de la population cellulaire constitue l'un des thèmes les plus importants du travail que nous présentons ici.

Enfin en 1927 [123] LEMON mettait en évidence que les réponses cellulaires à l'agression de l'alvéole dépendent de la nature de l'agression. L'augmentation de cellules signalée par PERMAR (1920) [161] est due essentiellement à des granulocytes lorsque la particule étrangère est un microbe et, à des cellules mononucléées lorsqu'il s'agit de poussières et en particulier de silice.

II.2 - Macrophages et tissu alvéolaire

La mise en évidence dans l'alvéole de cellules capables de fixer les particules organiques ou minérales dans leur cytoplasme, a posé dès l'origine le problème des relations entre ces cellules et celles de la paroi alvéolaire. Ce problème touche à celui de l'origine des macrophages que nous examinerons plus en détail, mais, chronologiquement, il est au coeur de la controverse qui anima les histologistes sur la nature de l'alvéole lui-même.

En 1697 [135] MALPIGHI décrivait l'espace alvéolaire du poumon de la grenouille comme constitué des dilatations des voies bronchiques. Un siècle et demi plus tard W. ADDISON (1842) [2] notait que la paroi alvéolaire était constituée par du tissu conjonctif et des vaisseaux non recouverts par un épithélium.

Cette interprétation n'était pas retenue par T. ADDISON (1843) [1], pour qui la face interne de l'alvéole était recouverte par un épithélium continu.

Les deux théories se partageaient la faveur des histologistes de l'époque avec des arguments tirés exclusivement de l'observation microscopique directe.

L'utilisation des imprégnations argentiques permit à ELENZ (1863) / 62 / et EBERTH (1864) / 59 / de proposer une théorie de synthèse, celle des larges plaques anucléées que KÖLLIKER (1881) / 107 / devait contribuer à rendre classique, pratiquement jusqu'à l'utilisation du microscope électronique, LOW (1952) / 126 /.

L'évolution de la conception de l'alvéole a dépendu, dès lors, du succès ou des échecs expérimentaux tendant à isoler les plaques anucléées. Sans entrer dans le détail, nous retiendrons deux tentatives intéressantes, celle de LANGE (1909) / 115 / qui opéra un rinçage endotrachéal du poumon, pour isoler les cellules dans les culots de centrifugation et ne parvint pas à démontrer l'existence de cellules de la paroi alvéolaire, et celle de MILLER (1937) / 148 / qui montra la première image de décollement par l'oedème des cellules de la paroi.

Plaques anucléées ou revêtement cellulaire continu, il ne faisait aucun doute pour les auteurs classiques, tels que CLARA (1936) / 45 / que l'origine du revêtement était épithéliale : "Toutes les données embryologiques, physiologiques et pathologiques sont en faveur d'une origine épithéliale des épicytes de l'alvéole du poumon". A quelques exceptions que nous verrons plus tard, il ne faisait pas de doute non plus que les cellules que l'on retrouvait desquamées dans l'alvéole lors des alvéolites catarrhales provenaient des cellules du revêtement alvéolaire.

Dans son ouvrage "Le poumon", POLICARD (1965) / 165 / peut encore écrire : "Les cellules du revêtement alvéolaire sont douées de propriétés phagocytaires notables".

C'est en partie à cause des propriétés de phagocytose des cellules de l'alvéole que POLICARD (1926) / 164 / ouvrit une brèche dans la théorie alors classique des plaques anucléées. Tirant argument de la phagocytose, il défendit l'origine mésenchymateuse des macrophages alvéolaires et en même temps celle des cellules de la paroi dont on admettait qu'elles étaient à l'origine des phagocytes.

Il reprit la conception du développement foetal du poumon et soutint que les cellules épithéliales du stade glandulaire disparaissent au moment de la crise néonatale et laissent le conjonctif et les vaisseaux à nu dans la plus grande partie de l'alvéole.

Des cellules issues du mésoderme, repoussées par le bourgeon endodermique de l'intestin primitif se différencient en cellules, d'abord fixes, puis libres à l'intérieur de l'alvéole, et capables de phagocytose. Cette théorie ne devait perdre son crédit qu'avec la description précise de la structure de l'alvéole au microscope électronique.

Encore fallut-il attendre plusieurs années après la description de LOW (1952) [126] pour que fût admise la présence d'une membrane basale différente de la basale de capillaires.

Sur cette membrane reposent deux types de cellules, les unes très aplaties couvrant 90 % environ de l'alvéole, les pneumocytes I, les autres faisant saillies dans la lumière alvéolaire au cytoplasme bourré d'inclusions pseudo myéliniques, les pneumocytes II, BERTALANFY (1964) [15].

A l'intérieur de l'alvéole on notait des cellules présentant une parenté morphologique avec les pneumocytes II, présentant eux-mêmes souvent les mêmes inclusions pseudomyéliniques et des vacuoles de phagocytose : Les macrophages alvéolaires, KARRER (1958) [102].

II.3 - Origine des macrophages alvéolaires

A ce stade le problème du macrophage alvéolaire se résumait de la manière suivante :

- Il existe des phagocytes intraalvéolaires morphologiquement comparables à certaines cellules de la paroi
- Les cellules de la paroi sont d'origine épithéliale

Après le caractère histocytaire attribué aux cellules de la paroi par MAXIMOFF (1924) [141] et la théorie de l'origine mésenchymateuse des petites cellules nucléées du poumon de POLICARD (1926) [164], le problème moderne de l'origine des macrophages prenait naissance.

Toutefois avant d'envisager les arguments qui soutiennent les théories de l'origine extrapulmonaire des macrophages alvéolaires, nous nous attarderons quelque temps sur les relations entre le pneumocyte granuleux et le macrophage.

II.3.1 Relations entre pneumocyte II et macrophage alvéolaire.

Pour les auteurs anciens, nous l'avons vu, la distinction n'est pas établie, BRODERSEN (1933) [28] soutient que les cellules à poussières de la cavité alvéolaire sont un état fonctionnel différent des cellules de la paroi, en ceci il est suivi par la plupart des pathologistes qui décrivent des étapes de libération des cellules pariétales au cours des alvéolites catarrhales.

MACKLIN (1954) [133], à l'aide de la technique de coloration par l'hématoidine, conclut à deux types cellulaires distincts : le macrophage et le pneumocyte.

La nature sécrétoire des pneumocytes II, mise en évidence par MACKLIN (1938) [130], puis confirmée définitivement par les travaux de BUCKINGHAM et coll. (1966) [31], distingue maintenant nettement les cellules de la paroi de cellules qui fixent les poussières.

Cependant les observations de CASARETT et MILLEY (1964) [37-1], CASARETT, METZGER et CASARETT (1967) [37], LADMAN et FINLEY (1966) [112], qui montrent la présence de particules à l'intérieur des vacuoles de pneumocytes II, les observations au microscope électronique de MOROSOVA et MOROKHOVA (1968) [151] laissent subsister encore quelque doute quant à la différence fondamentale qui pourrait séparer le macrophage et le pneumocyte granuleux.

Les arguments cytochimiques de SOROKIN (1966) [196], de CAULET et coll. (1969) [38], puis surtout ceux de CORRIN (1969) [52], obligent à l'heure actuelle à conclure que les quelques particules observées dans les pneumocytes II, pénètrent lors de l'exocytose de figures myéliniques, secrétées par ces cellules.

L'origine pariétale des macrophages alvéolaires, soutenue à l'origine par TCHISTOVITCH (1889) [205], HERXHEIMER (1903) [92], puis par SEWELL (1918) [191], WESTHUES (1922) [218], GROSS (1927) [81], CARLETON (1934) [34] CAPELL (1929) [33], et défendue essentiellement par des arguments morphologiques ou à partir des observations consécutives aux colorations supravitales ne semble donc plus pouvoir être retenue.

II.3.2 Relations entre les histiocytes de la paroi alvéolaire et les macrophages intraalvéolaires

L'origine locale histiocyttaire, ASCHOFF (1924) [5], des macrophages alvéolaires a été proposée à l'origine par KIYONO (1914) [106]. Plus tard LANG (1926) [115-1], puis POLICARD (1926) [164], soutiennent cette hypothèse et nous avons vu que ceci conduisait à admettre que le revêtement alvéolaire était d'origine mésenchymateuse, point de vue partagé plus tardivement par MARSHALL (1946) [136], sur la base des colorations par imprégnation argentique.

Cette conception basée sur l'assimilation du pneumocyte II et de la cellule à poussière ne sera pas discutée plus avant. Elle est contemporaine du point de vue défendu initialement par MALLORY (1914) [134], qui adhérait à l'hypothèse de METCHNIKOFF (1892) [145], selon laquelle les macrophages pouvaient dériver des cellules endothéliales capillaires, PERMAR (1920) [161], FOOT (1920) [69], adhèrent partiellement à cette hypothèse fortement combattue par ASCHOFF (1926) [6], MAXIMOFF (1927) [141-17], CAPPELL (1929) [33], FRIED (1934) [73], qui observèrent systématiquement les endothéliums capillaires au cours de phénomènes inflammatoires et ne purent jamais mettre leur rôle en évidence.

L'existence, comme dans tout tissu conjonctif, d'histiocytes dans les parois pulmonaires a pu être invoquée pour soutenir une origine locale des macrophages pulmonaires : MOORE et SCHOENBERG (1965) [149] mettent en évidence une migration d'histiocytes depuis la paroi jusque dans l'alvéole après stimulation par l'adjuvant de Freund; COLLET et coll. (1967) [49] donnent des preuves particulièrement évidentes de passage cellulaire au travers de la paroi alvéolaire. Toutefois, seuls BOWDEN et coll. (1969) [22] font des cellules septales une source importante de macrophages intraalvéolaires.

II.3.3 L'origine extrapulmonaire des macrophages alvéolaires

Depuis SLAVJANSKY (1869) [195], nous l'avons vu plus haut, on sait que des cellules circulantes peuvent traverser la paroi alvéolaire pour gagner l'alvéole et s'y comporter en macrophages. METCHNIKOFF (1901) [146] écrivait déjà : "Depuis longtemps les grandes cellules à poussières ont été considérées comme des cellules épithéliales, capables de fixer les particules de charbon, les microorganismes et d'autres corps étrangers . En réalité, ces éléments ne sont rien d'autre que des globules blancs, qui ont émigré dans les alvéoles et dans les bronches". La filiation entre le monocyte ou le lymphocyte sanguins et le macrophage allait devenir un sujet brûlant de controverse, dont l'issue est probablement apparue 59 ans plus tard, lors du colloque sur les "fonctions immunologiques des macrophages" organisé par FAUVE pour la Société Française d'Immunologie dans l'amphithéâtre même, où comme le remarquait DELAUNAY (1970) [56], METCHNIKOFF présenta la plupart de ses travaux.

II.3.3.1. Origine lymphocytaire

Depuis le travail original de METCHNIKOFF (1888) [144], de très nombreux auteurs dont YERSIN (1888) [219], RANVIER (1900) [170], MAXIMOFF (1903) [140], POLICARD et DEPLA (1917) [163], DOMINICI (1920) [57], ont décrit des processus de migration des lymphocytes dans les inflammations et les transformations progressives de ces cellules par hypertrophie cytoplasmique en grandes cellules mononucléées puis en macrophages et en cellules géantes. En fait, si on examine les textes de METCHNIKOFF (1901) [146]: "l'immunité dans les maladies infectieuses" on se rend compte que la paternité qu'on reconnaît à ces auteurs pour l'origine lymphocytaire du macrophage repose pour le moins sur une ambiguïté. A cette époque la distinction des cellules blanches du sang n'est pas achevée; la première étude du monocyte ne sera faite qu'en (1938) [20] par BLOOM. METCHNIKOFF reconnaît d'ailleurs que seules les cellules à grand cytoplasme au noyau simple "riche en chromatine" sont capables d'ingérer et de résorber les corps étrangers, mais il pense que ces cellules représentent un stade plus évolué des lymphocytes typiques.

Plus tard ASCHOFF (1924) [5] sera plus prudent et disposant de critères morphologiques plus précis, pourra écrire à propos de la propriété des lymphocytes à se transformer en phagocytes: "je peux seulement dire qu'il n'y a aucune preuve certaine d'une telle transformation".

Avec le développement des techniques cytologiques de nombreux auteurs ont par la suite défendu cette théorie. KOLOUCH (1939) [108] en a donné une analyse critique détaillée dont nous retiendrons en particulier l'expérimentation de BLOOM (1927) [19], qui conclut à la transformation des lymphocytes en "polyblastés" par la méthode de culture de tissu à partir des lymphocytes recueillis dans le canal thoracique.

C'est cependant avec les observations de REBUCK et CROWLEY (1955) [172] obtenues par la technique de la fenêtre cutanée que commence l'aspect moderne de la controverse. Ces auteurs observent au cours d'une inflammation locale la multiplication d'histiocytes locaux et surtout la différenciation de lymphocytes et monocytes en macrophages typiques. BRAUNSTEINER et coll. (1958) [25] confirment ce point de vue en montrant que la transmission de l'allergie de type retardé peut être assurée par les cellules adhérant à la lamelle (propriété dont sont dépourvus les lymphocytes du sang) insérée sur une fenêtre cutanée. Or, écrivent-ils, seules les cellules lymphoïdes, du sang en particulier, sont capables de transférer ce type d'immunité.

HOWARD (1964) [96], en utilisant des chimères avec un marqueur chromosomique, montre qu'au cours de la réaction Greffon-Hôte, les cellules de Küpffer du foie prennent le caryotype des lymphocytes du donneur. PINKETT et coll (1966) [162], en utilisant un marqueur chromosomique chez la souris irradiée, montrent que les macrophages du poumon dérivent en partie des lymphocytes du donneur. HOWARD et coll. (1969) [98] montrent que ce résultat peut être étendu à la souris non irradiée dans le cas de la réaction Greffon-Hôte. Ce phénomène semble pouvoir être généralisé aux phénomènes de réaction intense du SRH selon BOACK et coll. (1968) [21]. Ces auteurs admettent toutefois que dans les conditions physiologiques les macrophages ont la même origine que les monocytes.

Par souci historique, nous retiendrons enfin l'expérience de GOUGH et coll (1965) [79], qui montra que "in vitro" des macrophages pouvaient se former aux dépens des cultures pratiquement pures de lymphocytes du sang à condition d'y ajouter des extraits de polynucléaires. Ces résultats "in vitro" apparaissent toutefois difficilement applicables aux conditions physiologiques.

Ces observations ont toutes fait l'objet de critiques passionnées.

En ce qui concerne les cultures de tissus l'absence de pureté des cultures cellulaires a suscité des objections rassemblées par TROWELL (1965) [207].

Les expériences de REBUCK et CROWLEY (1955) [172] ont été reprises par RIIS (1959) [175], qui ne peut conclure à l'existence d'image de transition. VOLKMAN et GOWANS (1965) [216], en utilisant le marquage à la thymidine tritiée et la technique de la fenêtre cutanée, ne peuvent confirmer la transformation des lymphocytes.

La transmission de l'allergie retardée invoquée par BRAUNSTEINER et coll (1958) [25] ne peut plus être retenue comme un critère absolu depuis que HAN (1966) [87] a pu transférer ce caractère par injection de macrophages.

En ce qui concerne les expérimentations basées sur le marquage chromosomique la meilleure critique est venue de l'équipe dirigée par HOWARD lui-même. BELL et SHAND (1970) [12], lors du "Colloque sur les fonctions immunologiques des macrophages" tenu à l'Institut Pasteur de Paris, ont montré à l'aide de colorations vitales que les cellules isolées par cathétérisme du canal thoracique contenaient des cellules monocytaires.

II.3.3.2 Origine monocytaire

A l'heure actuelle, il ne fait donc pratiquement plus de doute que les macrophages dérivent soit du monocyte soit d'une cellule commune aux deux types cellulaires. CARREL et EBELING (1926) [36] donnèrent les premières preuves expérimentales de la transformation macrophagique des monocytes en culture de tissu, mais il appartient à LEWIS (1925) [124], CLARK et CLARK (1930) [46] d'avoir fourni in vivo les observations les plus convaincantes. LEWIS (1925) [124] constate dans le poumon de la grenouille la transformation des monocytes en macrophages, à l'intérieur des capillaires. CLARK et CLARK (1930) [46] observent directement sur la queue de larves d'amphibiens le passage des monocytes du sang et leur transformation en macrophages typiques dans le tissu sous cutané.

Il faut accorder moins de crédit aux observations de ELIOT (1926) [63], qui constata, après injection de cellules sanguines marquées par le carmin, la présence de cellules recélant le colorant dans le poumon, la rate et le foie. Sans nier la réalité du phénomène particulièrement mis en évidence pour les phagocytes alvéolaires par UNGAR et WILSON (1935) [208], il faut en effet avec HEPPLESTON (1970) [91] émettre de sérieuses réserves quant à la valeur démonstrative de la technique du marquage cytoplasmique.

A partir du travail présenté par EBERT et FLOREY (1939) [60], qui en montre l'évolution à l'aide de la fenêtre sous cutanée, l'existence de ce phénomène ne peut plus être mise en doute. Les études ultérieures auront pour objet de préciser l'importance physiologique ou physiopathologique de ce phénomène et de rechercher, parmi les cellules souches des cellules sanguines, la lignée dont sont issus les monocytes :

- Origine médullaire pour NAEGELI (1931) [154];
- Origine réticulohistiocytaire pour SCHILLING (1943) [187].

Les acquisitions importantes en ce domaine ont été essentiellement dues au développement des marquages permettant d'identifier les cellules par ce qu'elles ont de plus stable : leur génome.

GORER et O'GORMAN (1956) [78] ont montré les possibilités d'identification des cellules d'un donneur, lors de greffes cellulaires, par utilisation de l'isoantisérum spécifique en présence de complément. REICHARD et

et ESTBORN (1951) [174] ont proposé l'utilisation de la thymidine comme précurseur de l'ADN. HOWARD et coll (1965) [97] ont montré l'intérêt des réactions greffon contre hôte, en utilisant les propriétés morphologiques du chromosome T6, dans la souche de souris CBA, qui permettent une identification rapide de l'origine cellulaire à partir du caryotype.

Le rôle déterminant joué par ces techniques ne permet pas cependant de laisser dans l'ombre les recherches effectuées d'abord par LEDER (1967) [120], puis par SCHMALZ et BRAUNSTEINER (1969) [188], sur l'identification de la lignée monocyttaire par la révélation histochimique d'estérases non spécifiques fluorosensibles.

BALNER (1963) [8] fut le premier à montrer que chez la souris irradiée les macrophages péritonéaux se différenciaient à partir de cellules médullaires ; ces résultats furent confirmés par GOODMAN en 1964 [77]. VOLKMAN et GOWANS (1965) [216] montrèrent que les macrophages sous cutanés se formaient à partir des monocytes du sang eux-mêmes issus de cellules médullaires. Ils confrontèrent leurs résultats avec ceux de SCHOOLEY et GIGER (1962) [189], OSMOND et EVERETT (1964) [160], CUDKOWICZ et coll. (1964) [54], qui indiquent l'existence d'une cellule lymphocytaire dans la moelle et suggérèrent que cette cellule pourrait s'identifier avec un précurseur des macrophages. SPECTOR et coll. (1965) [197] arrivaient en même temps à conclure à l'origine monocyttaire des macrophages qui envahissent le derme après stimulation par le fibrogène et l'huile de paraffine. Par la suite PINKETT et coll (1966) [162] conclurent que 60 % des macrophages alvéolaires avaient une origine médullaire puis VIROLAINEN (1968) [212] confirme les résultats de BALNER (1963) [8] pour les macrophages péritonéaux à l'aide des marqueurs chromosomiques, alors que VAN FURTH et coll. (1968) [209] arrivaient au même résultat à l'aide du marquage à la thymidine.

Ainsi la plupart de ces travaux indiquent qu'aussi bien à l'état physiologique que dans les processus inflammatoires il existe une filiation directe entre le monocyte et le macrophage.

II.4 - Durée de vie, migration, excrétion des macrophages alvéolaires

La durée de vie des cellules, leur voie d'excrétion ou de disparition, la part prise par les macrophages venant d'autres tissus dans le pool local sont autant de problèmes qui ont suscité, depuis de nombreuses années, l'intérêt des chercheurs, notamment en ce qui concerne le poumon.

BERTALANFFY et LEBLOND (1953) [147] ont été les premiers à évaluer la vitesse du renouvellement des cellules alvéolaires chez le rat. A cette fin, ils ont utilisé la technique de blocage des cellules en métaphase par la colchicine. Leurs observations les conduisent à distinguer deux types cellulaires, le premier rassemble les cellules au cytoplasme riche en vacuoles, auxquelles ils affectent une période de renouvellement de 29 jours environ, le deuxième les cellules non vacuolaires qui sont remplacées après une durée de vie moyenne de 8 jours. Partisans convaincus de l'origine pulmonaire des macrophages alvéolaires, ils concluent : "ainsi l'aspect normal et le nombre des cellules de l'alvéole est le résultat d'un équilibre dynamique entre leur multiplication par mitose et leur élimination par les voies aériennes".

A leur suite SPENCER et SHORTER (1962) [200], puis SHORTER, TITUS et DIVERTIE (1964) [192], à l'aide de la technique du marquage par la thymidine tritiée, montrent que les cellules à renouvellement le plus rapide correspondent aux macrophages alvéolaires. Leurs observations leur permettent en outre d'apprécier à 8 heures la durée de la phase de synthèse.

SIMNETT et HEPPLESTON (1966) [193] reprennent la technique à la colchicine chez la souris et avec des doses beaucoup plus fortes étudient l'influence du sexe, de l'âge et de la souche sur les modalités de renouvellement des cellules alvéolaires. Ils observent ainsi une période de renouvellement de 20 à 84 jours chez les animaux de trois mois et de 71 jours pour ceux de 12 à 24 mois. La phase de synthèse est évaluée à 48 heures dans les cas de renouvellements rapides et à 37,2 heures dans les cas de renouvellements les plus lents. Le sexe et la souche sont identifiés comme facteurs importants du renouvellement cellulaire.

Explicitement ou implicitement dans ce type de recherche sur la durée de vie des macrophages alvéolaires, les différents auteurs posent comme hypothèse une origine locale de ces cellules. Nous avons vu ce qui pouvait être objecté à cette hypothèse. Si on revient à l'origine monocyttaire, il faut mettre en oeuvre d'autres protocoles expérimentaux et en cette matière SPRITZER, WATSON, AULD (1964) [201] ont eu le mérite de proposer une méthodologie indépendante de l'hypothèse faite sur l'origine des cellules. Ils déterminent le renouvellement en dénombrant les cellules excrétées par la voie trachéobronchique et dégluties dans l'oesophage. Plus de 20×10^6 cellules mononucléées sont ainsi excrétées et dégluties chaque jour.

Par ailleurs, depuis MACKLIN (1947) [131], on sait qu'il est possible d'extraire les macrophages alvéolaires, soit par lavage endobronchique, soit par extraction dans une solution saline des fragments isolés de tissu pulmonaire. Différentes méthodes ont ainsi permis d'apprécier de manière semi-quantitative la population alvéolaire totale ; les résultats sont extrêmement variables : pour LABELLE et BRIEGER (1959) [110], les cellules extraites par lavage sont en nombre voisin de 10^4 chez le rat. Avec la codification de MYRVIK (1961) [153], cette technique donne des valeurs en général supérieures à 10^6 . La technique décrite par SPRITZER et coll (1968) [202] permet d'atteindre 3×10^6 . BENNETT (1966) [13], sur le poumon de souris, il est vrai, assure obtenir des résultats meilleurs en rinçant le tissu dans une solution saline. Il appartient cependant à BRAIN et FRANCK (1968) [24], malgré les critiques de GROSS et coll. (1969) [82] d'avoir fourni les meilleurs éléments de compréhension et de reproductibilité de la technique d'extraction des macrophages alvéolaires par lavage endobronchique. Les valeurs ainsi obtenues sont en général supérieures à 10^7 cellules dans les poumons du rat adulte. Compte-tenu des 2×10^7 cellules éliminées par 24 heures SPRITZER et coll. (1968) [202], la durée de vie moyenne des cellules intraalvéolaires paraît relativement courte.

Cet avis n'est pas partagé par VAN FURTH (1970) [210] qui à l'aide de la thymidine tritiée suit l'évolution dans le temps du nombre des macrophages du poumon de rat adhérant au verre, après une injection intraveineuse du métabolite. Cette observation conduit à un temps de séjour des macrophages dans l'alvéole de l'ordre de 50 jours. Cette évaluation est proche des durées de vie observée par CLIFF (1966) / 46-1 / qui conclut à une survie possible de 100 jours et plus pour le macrophage en général, elle est encore éloignée cependant des observations in vitro de CHANG (1964) [42] qui admet une durée de vie de 220 jours.

Les travaux de NICOL et BILBEY (1958) [157], puis de NICOL et CORDINGLEY (1966) [58] permettent de concilier la théorie de l'origine monocyttaire et celle d'un renouvellement rapide des cellules alvéolaires. Ils montrent en effet après injection de fines particules de carbone que les cellules de Küpffer du foie et des macrophages des autres tissus sont éliminés par remontée trachéobronchique. Ainsi, la plus grande part des monocytes du sang qui disparaissent avec une période de 22 heures, VAN FURTH (1970) [210] ou 2 à 6 jours LEDER (1967) [120] gagnerait le foie et les autres tissus dont ils seraient éliminés par la voie trachéobronchique. Si l'existence d'une migration des particules depuis le foie jusque dans le poumon ne peut être niée : IRWIN (1932) [101] l'importance quantitative de ce phénomène paraît toutefois assez faible d'après les travaux d'ADLERSBERG (1969) [3]. Il est possible, comme l'ont remarqué GIESEKING (1958) [75] puis HEPPLESTON (1970) [91], que ces phénomènes soient liés à la nature de la

particule fixée dans le cytoplasme des macrophages.

Dans la partie expérimentale de notre travail que nous abordons maintenant, nous nous efforcerons d'analyser la cinétique des phénomènes de transport à l'aide de la théorie des compartiments.

Nous utiliserons la technique des traceurs radioactifs inhalés dont l'origine remonte à KREUGER et coll.(1944) [109] utilisés chez l'animal successivement par CEMBER et coll.(1954) [39-3], (1955) [39-2], (1956) [39-1], LABELLE et BRIEGER (1959) LABELLE et Coll.(1960) [111], BAIR (1960) [7], MORROW-CASARETT (1960) [150-1], CEMBER, WATSON, NOVAK (1961) [40], FRIBERG et HOLMA (1961) [71], BRIEGER (1963) [26] puis par la suite soumis à l'analyse critique de HATCH et GROSS (1964) [89]. FRIBERG et HOLMA (1967) [72] puis LEFEVRE et coll.(1968) [121] ont codifié en outre différentes techniques dont nous nous inspirerons pour étudier l'influence des différents facteurs sur l'épuration alvéolaire.

III - MATERIEL ET TECHNIQUES

III.1 - Les souches d'animaux

Les animaux utilisés dans notre travail sont des rats appartenant à trois lignées différentes et élevés dans trois états microbiologiques différents selon le schéma suivant :

a) lignée WISTAR/WAG/GIF les animaux sont élevés dans les laboratoires du Département de Protection* soit en état HOLOXENIQUE c'est à dire selon les méthodes traditionnelles d'élevage, soit en état HETEROXENIQUE, c'est à dire qu'ils ont été recontaminés par une microflore où n'existe certainement aucun agent pathogène, après avoir été recueillis de leurs ascendants par hystérectomie aseptique et maintenus artificiellement dans un milieu contrôlé.

b) lignée FISCHER/GIF (lignée consanguine) utilisée soit en l'état HETEROXENIQUE soit en l'état AXENIQUE, c'est à dire totalement stérile.

c) lignée O.F.E. (C.F.E. Sprague Dawley) utilisée en état HETEROXENIQUE. Tous les animaux sont élevés dans des conditions équivalentes de température, de pression, d'hygrométrie et d'éclairement à l'exception des animaux AXENIQUES qui, du fait de leur état microbiologique, vivent et se reproduisent dans un système écologique clos et stérile (isolateur de type trexler en film de matière plastique) et sont élevés selon les techniques définies par SACQUET. Tous les animaux reçoivent ad libitum une alimentation pellettisée, équilibrée et éprouvée de longue date dans le laboratoire ainsi que de l'eau stérilisée désionisée.

III.2 - Les méthodes d'extraction cellulaire

Trois techniques de lavage endobronchique ont été comparées. Celle décrite par MYRVICK en 1961 [153], celle décrite par SPRITZER en 1968 [202] et celle décrite par BRAIN en 1968 [24].

Technique de MYRVICK :

Les animaux sont anesthésiés au Nembutal à la dose de $0,5 \text{ cm}^3$ par voie intrapéritonéale d'une solution à 5 %. Ils reçoivent en outre 250 U.I d'héparine. La cavité abdominale est ouverte et les rats sont saignés par section de l'aorte abdominale. Le diaphragme est alors ponctionné avec une pointe mousse et un large volet costal est dégagé pour extérioriser le bloc cardio-pulmonaire. L'oreillette droite est alors sectionnée et on injecte dans l'artère pulmonaire 20 cm^3 d'une solution physiologique de chlorure de sodium contenant 50 U.I d'héparine et $2 \times 10^3 \text{ g}$ de procaine par cm^3 . Ce traitement permet d'éliminer

* Centre d'Etudes Nucléaires de Fontenay-aux-Roses - Responsable Dr. GUENET

toutes les cellules sanguines de la petite circulation. Le poumon apparaît alors de couleur isabelle.

Le coeur et les gros vaisseaux sont dégagés, la trachée est cannu-
lée avec un cathéter 240 solidement ligaturé avec du fil de lin et la prépa-
ration ainsi obtenue est isolée de la cage thoracique.

Une solution isotonique de chlorure de sodium est injectée plusieurs
fois dans la trachée. Après chaque injection le tissu est massé doucement entre
les doigts et le liquide exprimé recueilli pour l'analyse cytologique.

Technique de SPRITZER

Elle se différencie de la précédente en ce qu'elle remplace le
massage par la distension. Ce résultat est obtenu par un remplissage forcé
des voies aériennes avec la solution nutritive : Hanks-tris à la lactalbumine
enrichie à 10 % avec du sérum de veau. Le poumon est injecté par la trachée
avec 10 cm³ de solution et introduit dans un récipient contenant la même
solution maintenue à 37° l'ensemble est incubé 10 minutes. Le liquide est
recueilli et le poumon est rincé une fois.

Technique de BRAIN

Le même protocole de sacrifice des animaux est utilisé, mais après
isolement du poumon, on place l'organe dans une chambre à vide sous une pres-
sion de quelques centimètres de mercure pendant 10 minutes. La préparation
est ensuite rincée douze fois consécutives avec 5 cm³ d'une solution physio-
logique de chlorure de sodium à 9 g %/100. Cette opération est réalisée à la
seringue montée hermétiquement sur le cathéter. Le tissu est injecté pendant
1 minute dans un becher plein de liquide de manière à équilibrer la pression
exercée par le poids du liquide introduit. On attend 1 minute avant d'aspirer
vivement le liquide de rinçage et on exprime les dernières gouttes de chaque
rinçage en retournant sans masser le poumon au-dessus du vase à prélèvement.

III.3 - Réalisations des échantillons

Les liquides de lavage pulmonaire sont homogénéisés et éventuelle-
ment des prélèvements aliquotes sont réalisés pour les dosages chimiques ou
radioactifs.

Une numération directe des cellules est pratiquée à la cellule hématimétrique de Thoma, sur un microscope équipé de contraste de phase et du dispositif de polarisation, de manière à distinguer nettement les cellules parmi les débris et les sphérules phospho-lipidiques qui présentent entre Nicols-croisés l'image de la croix de Malte : fig. 1 et 2

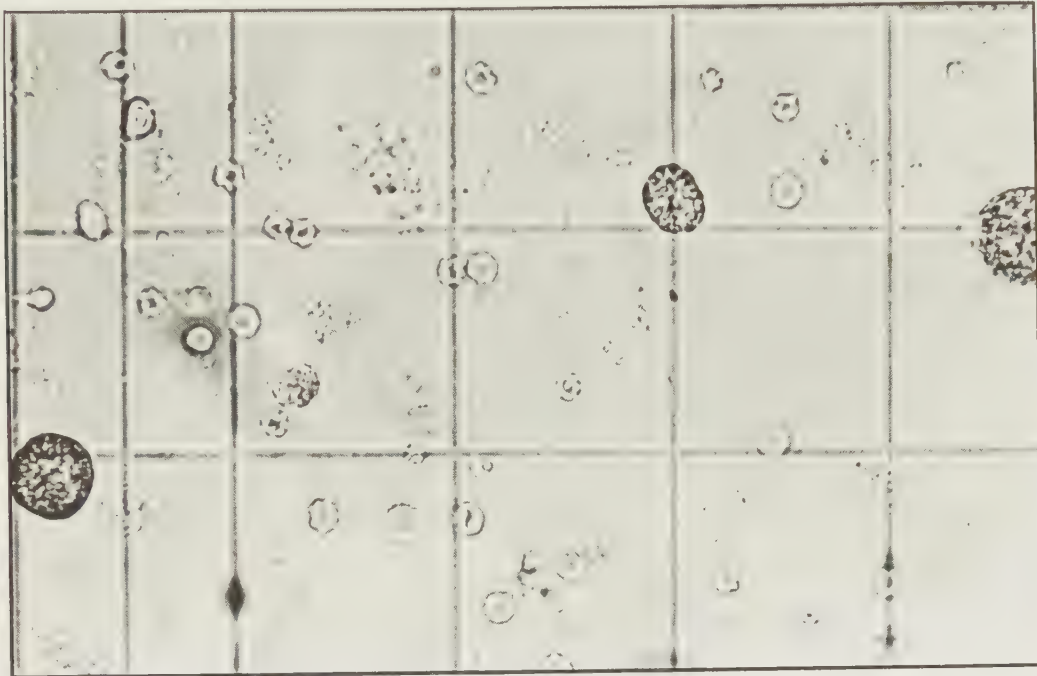


Fig.n° 1 - Macrophages hématies et débris cellulaires vus à la cellule de Malassez



Fig.n° 2 - Sphérule lipidique et macrophage chargé de sphérules vus en lumière polarisée

Quatre mesures au moins sont effectuées sur les liquides conservés dans des flacons de polyéthylène pour éviter l'adhérence des macrophages aux parois.

Des frottis cellulaires sont pratiqués rapidement après centrifugation à 150 g pendant 4 minutes dans une microcentrifugeuse. Les cellules sont remises en suspension dans une goutte de sérum de veau et étalées à la lamelle tenue très souple entre deux doigts. Les lames sont fixées pendant vingt minutes au moins dans un mélange d'alcool, éther. Elles sont colorées ensuite dans un mélange aqueux d'Eosine azur tamponné à pH 6,4, mélange de Lillie et Pasternak : Eosine 0,1 % 15 cm³

Azur II 0,1 % 10 cm³

Tampon pH 6,4 x 10⁻² M 75 cm³

Après une demi-heure de coloration, les lames sont rincées et éventuellement rapidement différenciées à l'alcool à 95°.

La cytologie fine des cellules extraites est contrôlée au microscope électronique.* Les cellules rincées sont alors immédiatement centrifugées pendant deux minutes, le surnageant écarté et remplacé par le mélange de HIRSCH et FEDORKO (1968) [94].

Technique de fixation :

Glutaraldéhyde 2,5 % dans 0,1 M cacodylate pH = 7,4 : 1 partie

Acide osmique 1 % dans 0,1 M cacodylate pH = 7,4 : 2 parties

Les cellules sont remises en suspension dans le mélange, centrifugées immédiatement, mises en suspension à nouveau dans une goutte de fixateur, rassemblées dans le même tube et centrifugées définitivement au bout de 30 minutes à 500 g pendant quatre minutes.

Le culot obtenu est suffisamment homogène pour ne pas nécessiter une préinclusion dans la gélose. Il est rincé, puis fixé dans l'acétate d'uranyle, rincé à nouveau puis déshydraté et inclus dans l'Epon selon la technique de LUFT (1961) [128]. Les blocs sont coupés au couteau de diamant, les coupes colorées à l'acétate d'uranyle citrate de plomb selon les techniques classiques sont examinées sur microscope Philips EM 300.

* Nous remercions tout particulièrement le CERCHAR où M. LE BOUFFANT Chef du Département d'Analyse, le Docteur MARTIN et Madame NORMAND ont bien voulu nous faire profiter de leurs connaissances, de leur matériel et de leur patience.

Des contrôles histologiques sont pratiqués sur les poumons rincés ou non. Ces contrôles sont effectués en microscope optique uniquement, soit sur coupes à la paraffine après fixation par le fixateur de Brazil (DUBOSCQ-BRAZIL), soit sur coupes semi fines, après inclusion dans l'Epon. Dans ce dernier cas les prélèvements de 2 à 3 mm de côté sont fixés dans le mélange Hirsch et Fedorko, les blocs obtenus sont coupés à l'ultramicrotome sur toute la surface, en lames de 0,5 μ d'épaisseur avec des couteaux de verre. Les coupes sont colorées par l'Azur II en solution à 2 % tamponnée à pH 8,6 ou par l'Argento méthénamine de GOMORI après oxydation par le chloramine T (Fig. 3 et 4).

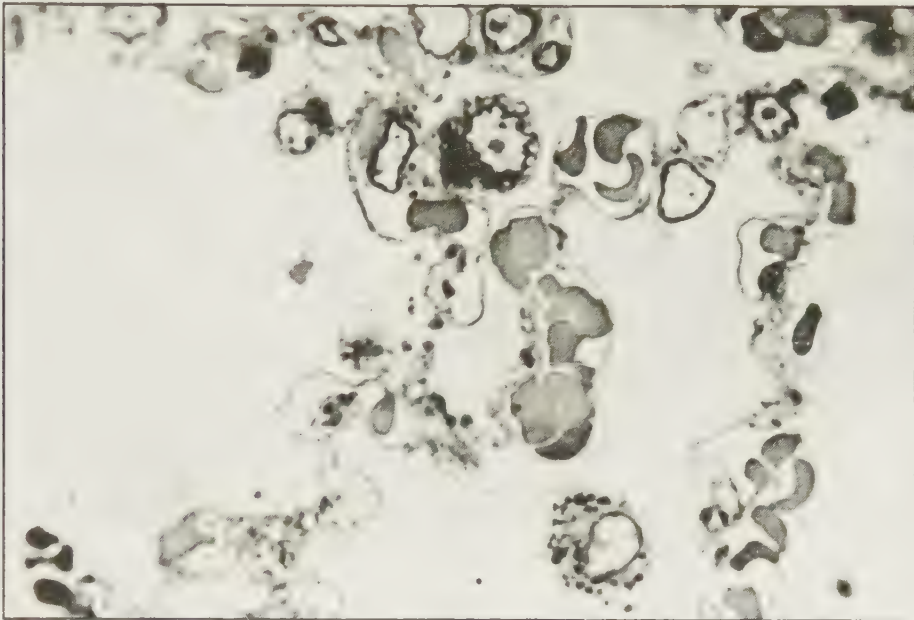


Fig. n° 3 - Poumon de rat - Coloration par l'Azur II à 2 %

Coupe de 0,5 μ . Noter l'intensité de la coloration des lysosomes secondaires dans le macrophage intraalvéolaire.

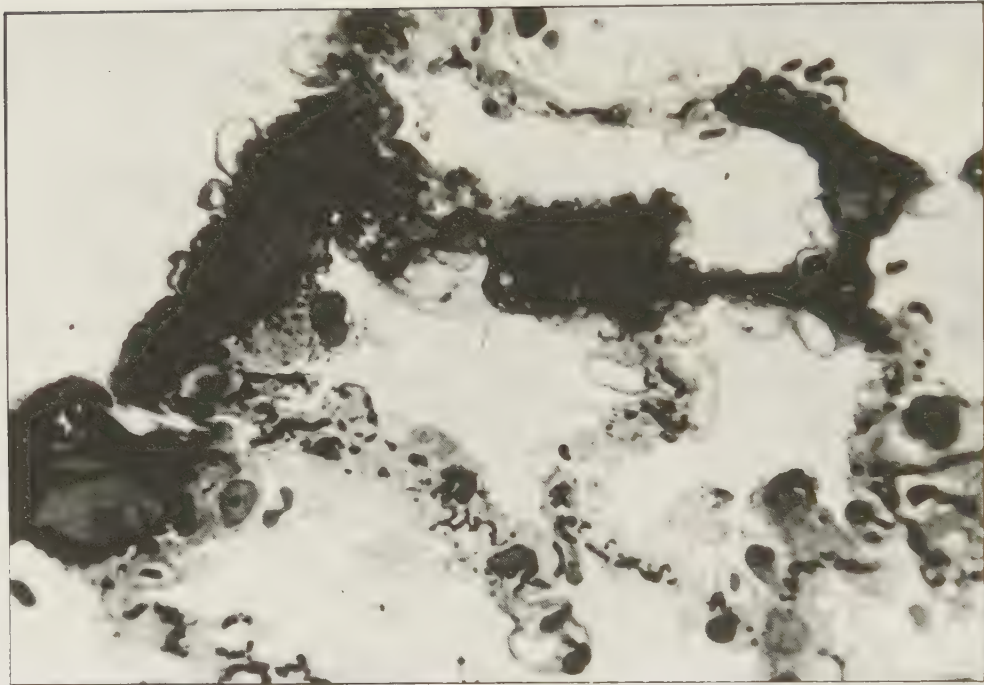


Fig. n° 4 - Poumon de rat après inhalation de ^{239}Pu .

Coupe semi-fine de $0,5\ \mu\text{m}$ colorée à l'argentométhénamine. Noter l'intensité de la coloration des fibres collagènes. A gauche et en haut à droite, phénomènes de thrombose et de sclérose vasculaires dues à l'irradiation α

III.4 - Mesure de la synthèse de l'A.D.N.

Une fraction des macrophages alvéolaires est capable de se diviser dans l'alvéole. Cette aptitude est appréciée de différentes manières :

a) Blocage des cellules en métaphase par la colchicine

Les animaux reçoivent par voie intraveineuse 0,4 mg de colchicine/100 g de poids. Après trois heures les cellules sont extraites de manière habituelle. On recherche sur frottis le pourcentage de mitoses dans la population de macrophages.

b) Incorporation dans l'A.D.N. d'un précurseur marqué

La technique décrite par MASSE et coll (1970) [138-17] a été utilisée. La thymidine tritiée est introduite dans les poumons par voie trachéale après isolement de l'organe. Le liquide de survie utilisé est celui de Mac-Coy* enrichi à 10 % de sérum de Veau. Le cathéter est oblitéré et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 20 minutes.

Afin de vérifier les données acquises, un certain nombre d'animaux ont reçu la thymidine in vivo par voie intratrachéale.

Les résultats sont appréciés de deux manières.

1° - Par autoradiographie

Les cellules sont isolées de la manière précédemment décrite après élimination du liquide d'incubation, le premier liquide de rinçage consiste en une solution 10^{-2} M de thymidine non radioactive.

Les frottis fixés non colorés sont recouverts d'émulsion K2 Ilford en gel selon une méthode dérivée de celle décrite par CARO et VANTUBERGHEM (1962), MASSE (1962) [138]. 1 gramme d'émulsion environ est porté à 38°C au bain-marie, dans un tube de polyéthylène. Après fusion du gel une goutte est prélevée à l'extrémité d'un tube de verre creux de 0,3 cm de diamètre intérieur. Une bulle de diamètre variable selon l'épaisseur de la couche souhaitée est soufflée à l'extrémité du tube. Elle est stabilisée sur un anneau de verre monté (Fig.n° 5)

* Milieu entroph. Laboratoire Eurobio.



Fig. 5. 1° Tube de verre servant à souffler l'émulsion
2° Tube contenant l'émulsion fondue
3° Bulle d'émulsion placée sur l'anneau de verre
4° Frottis cellulaire

puis déposée sur l'échantillon à l'endroit choisi. Les lames sont immédiatement déposées dans une chambre dont l'humidité dépasse 80 % ainsi que le recommande ROGERS (1967) [176]. Elles y demeurent environ trente minutes et sont ensuite stockées à + 4°. Elles sont révélées d'abord 8 jours puis trente jours après le début de l'exposition pour contrôle de l'activité des cellules faiblement marquées. Cette méthode très souple et très économique permet des colorations de bonne qualité au travers du gel et est moins sujette au voile de fond que les techniques habituelles par trempage ou par étalement (Fig. 6 et 7).



FIG.6 - Autoradiographie d'une cellule en phase de synthèse qui a fixé de l'hématite

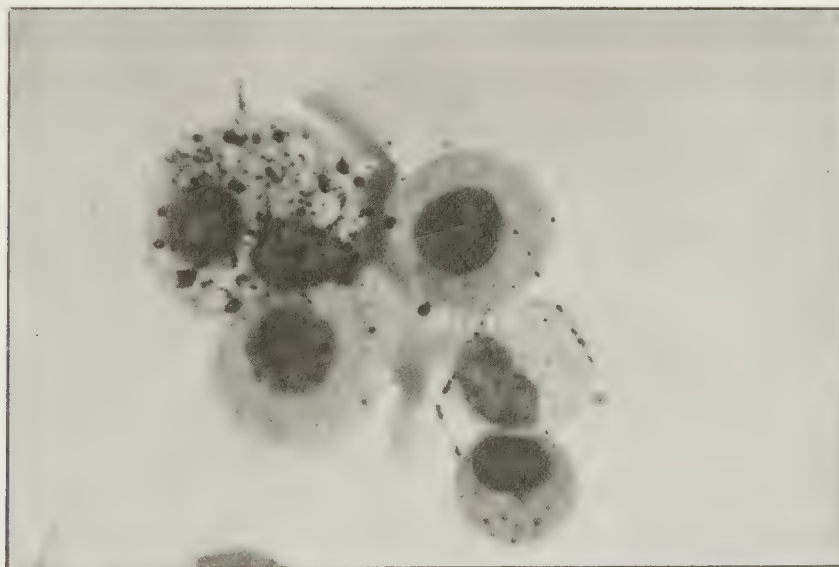


FIG.7 - Autoradiographie de traces α dans des macrophages pulmonaires

2° - "Carbotrimétrie"

Les cellules isolées après lavage avec la thymidine non radioactive sont centrifugées et lavées 3 fois au sérum physiologique. Avant la dernière centrifugation les cellules sont dénombrées à l'hématimètre. Les culots obtenus représentent au moins 500.000 cellules dans un tube de microcentrifugeuse.

Le surnageant est soigneusement éliminé et le culot est conservé dans le tube bouché à - 30°C jusqu'au moment où toutes les mesures peuvent être groupées. Des échantillons de même nature provenant de culture in vitro dans le même milieu de survie de fragments ganglionnaires sont réalisés au titre de témoin. A chaque opération on prélève et on mesure 1/10 de ml du milieu d'incubation contaminé de manière à ramener les mesures effectuées sur les cellules, à des valeurs comparables. Les culots cellulaires et les liquides d'incubation sont traités selon la méthode de LING (1968) [125].

Ils subissent une précipitation par l'acide trichloracétique suivie d'une hydrolyse par la soude. Après les rinçages appropriés, 0,2 ml de la solution limpide obtenue est mélangé avec 18 ml de liquide scintillant.

2,5 - Diphenyloxazol (PPO) 0,75 g

Alcool méthylique 75 ml

Toluène qu.S. 250 ml

et mesurés pour leur activité β .

Mesure de l'activité des macrophages

L'appareil utilisé est un appareil Intertechnique SL 40. La mesure de l'affaiblissement lumineux (quenching) des échantillons est appréciée par la méthode de l'étalonnage externe. Tous les échantillons sont affectés d'un quenching voisin de 3,2. Nous avons donc compté directement tous nos échantillons en coup/mm sans introduction d'une courbe d'étalonnage.

N°	t	A		B		C		$\frac{E_1}{I_A} / \frac{E_2}{I_B} \cdot \frac{B}{C}$
		c, c/mn d/mn	$\pm \frac{100}{\sqrt{c}} \%$	c, c/mn d/mn	$\pm \frac{100}{\sqrt{c}} \%$	c, c/mn d/mn	$\pm \frac{100}{\sqrt{c}} \%$	
IC	9	10.00 = 0000000.0	72.70	10.00 = 0000000.0	72.70	4921.4	.46	3.183
	9	10.00 = 0000000.0	72.70	10.00 = 0000000.0	72.70	4961.9	.46	3.200
	9	10.00 = 0000000.0	72.70	.1 60.07		4991.2	.46	3.204
I7	10	10.00 = 0000000.0	72.70	10.00 = 0000000.0	72.70	1494.2	.90	3.187
	10	10.00 = 0000000.0	72.70	10.00 = 0000000.0	72.70	1494.3	.90	3.191
	10	10.00 = 0000000.0	72.70	10.00 = 0000000.0	72.70	1484.4	.90	3.194
ET ₂	11	4.51	.2 72.70	.4 60.07		221489.2	.10	3.232
	11	4.49	.2 72.70	.6 49.64		222286.8	.10	3.246
	11	4.48	.2 72.70	.8 45.12		222816.6	.10	3.257
ET ₂	12	5.01	.1 72.70	1.3 37.28		199577.0	.10	3.221
	12	4.99	.2 72.70	.8 45.12		200372.6	.10	3.236
	12	4.98	.2 72.70	1.2 41.02		200521.3	.10	3.195
ET ₂	13	5.47	.1 72.70	.3 60.07		182598.5	.10	3.225
	13	5.45	.1 72.70	1.2 37.28		183157.0	.10	3.295
	13	5.44	.1 72.70	.5 49.64		183540.4	.10	3.277

Cette mesure de la quantité de thymidine fixée a pour but d'obtenir des données sur la vitesse de synthèse de l'A.D.N. dans les différentes cellules. Différentes solutions de thymidine à activité spécifique variable ont été utilisées de manière à connaître le rôle du pool de thymidine cellulaire dans la variabilité des résultats.

L'autoradiographie permet un contrôle des données obtenues notamment par l'utilisation du double marquage ainsi que l'ont décrit HILSCHER and MAURER (1962) [93]. A cette fin nous avons utilisé le protocole suivant :

Les animaux reçoivent par voie intratrachéale 100 μ Ci de thymidine tritiée dans 1/10 de cm^3 de solution physiologique. Après trois heures les animaux sont sacrifiés et leurs poumons sont incubés dans les conditions décrites avec 10 μ i de thymidine marquée au ^{14}C . Les frottis sont recouverts d'une couche épaisse d'émulsion NUC 715 Agfa Gevaert avec la "raclette" de BESCOL LIVERSAC (1960) [17] comportant un épaulement de 50 μ . Après exposition

convenable et révélation des lames les cellules marquées au ^{14}C , celles marquées à ^3H , celles marquées par les deux isotopes sont aisément identifiées (Fig. 8 et 9).

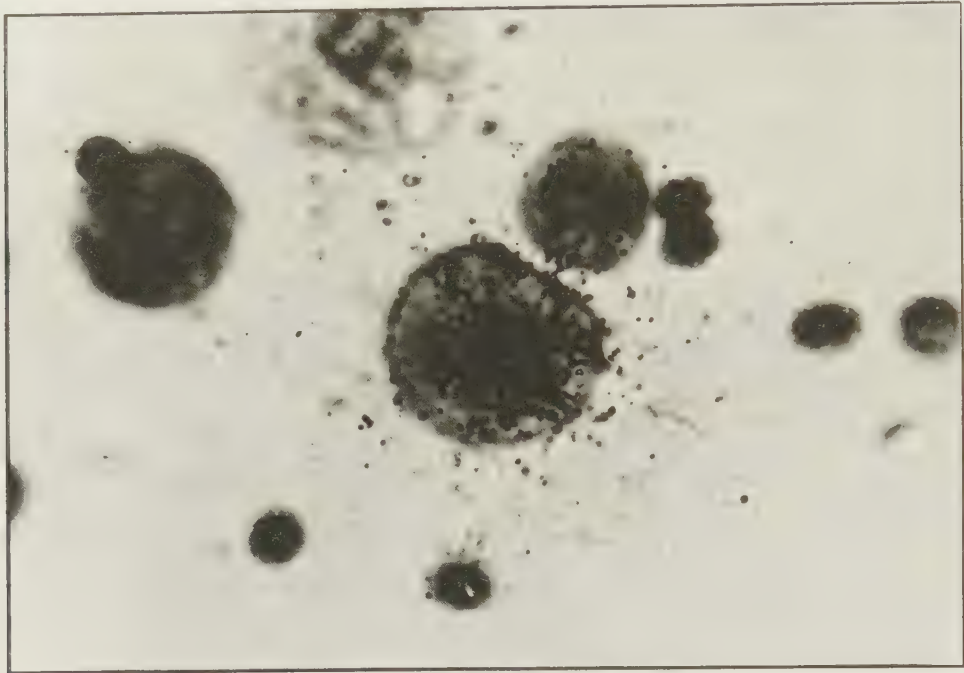


Fig. 8 - Autoradiographie : macrophage marqué par ^{14}C Thymidine seule

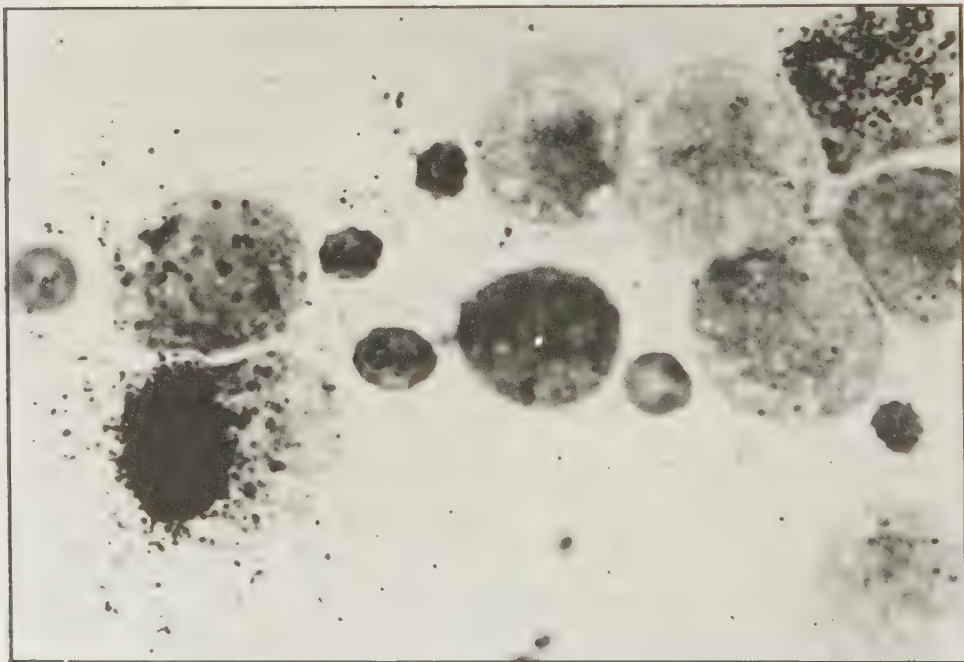


Fig. 9 - Autoradiographie : macrophage en bas à gauche ayant incorporé ^3H et ^{14}C . En haut à droite, incorporation de ^3H thymidine seulement.

III.5 - Les Techniques d'empoussiérage

Différents types d'aérosols et de poussières ont été mis en suspension et inhalés par les animaux pour permettre l'identification des cellules qui les ont fixés et l'appréciation du mode de réaction du tissu.

III.5.1. - Aérosol d'hématite

Il s'agit en fait d'un empoussiérage humide. L'hématite est un oxyde de fer non magnétique préparé par voie chimique, de qualité rouge à polir. Les particules unitaires sont inférieures à $1\ \mu$ et groupées en amas de moins de $5\ \mu$. La poudre sèche est soumise à l'irradiation neutronique de manière à obtenir l'activation du fer selon le schéma. Les échantillons sont soumis quatre semaines à un flux de 2×10^{13} neutrons/seconde/cm².

On obtient en moyenne une activité spécifique de 5 mCi/g, LEFEVRE et Coll.(1968) [121]. L'appareil utilisé est celui décrit par LEFEVRE et coll. (1968) [121], LEFEVRE (1969) [122] (Fig. n° 10).



Fig.10

Le générateur est inspiré de celui de LAUTERBACH , HAYES et COELHO (1956) [117] . La poudre d'hématite activée est mise en suspension dans l'eau continuellement agitée par un agitateur électromagnétique. Le brouillard est formé par un jet d'air comprimé à forte pression et faible débit (1,4 bar au travers de 3 trous de 0,3 mm de diamètre, donnant un débit de 3,5 litres par minute) arrivant à la surface du liquide.

L'aérosol produit est très dense, constitué de gouttelettes dont les tailles sont extrêmement diverses. Les plus grosses sont retenues par le piège que constitue le demi-tore tubulaire qui réunit le générateur à l'enceinte d'exposition.

La granulométrie est reproductible. Le diamètre maximum des gouttes qui échappent à ce piège est de 5 μ . L'enceinte d'inhalation comporte un volume réduit à 5 litres permettant une concentration élevée de l'aérosol. Les animaux sont introduits sans anesthésie dans des récipients à extrémité tronc-conique laissant dépasser l'extrémité nasale. Quinze de ces récipients peuvent être fixés radialement sur les parois de l'enceinte d'inhalation. Les rats demeurent 1 heure dans cette enceinte.

III.5.2. - Aérosol de Plutonium

Le même type d'appareillage est utilisé : NENOT (1970) [156]. La solution utilisée est un nitrate de ^{239}Pu contenant moins de 1 % de ^{240}Pu et maintenu à l'état dialysable par l'acidité du milieu.

III.5.3 - Empoussiérage de Silice

Cet empoussiérage est réalisé dans la chambre modèle CERCHAR - Fig. n° 11.

Chambre d'empoussiérage pour animaux - légende Fig.11

- 1° - distributeur de poussière
- 2° - colonne d'arrivée de la poussière
- 3° - dispositif de mesure de l'empoussiérage commandant la régulation automatique
- 4° - hélice de brassage
- 5° - évacuation de la poussière

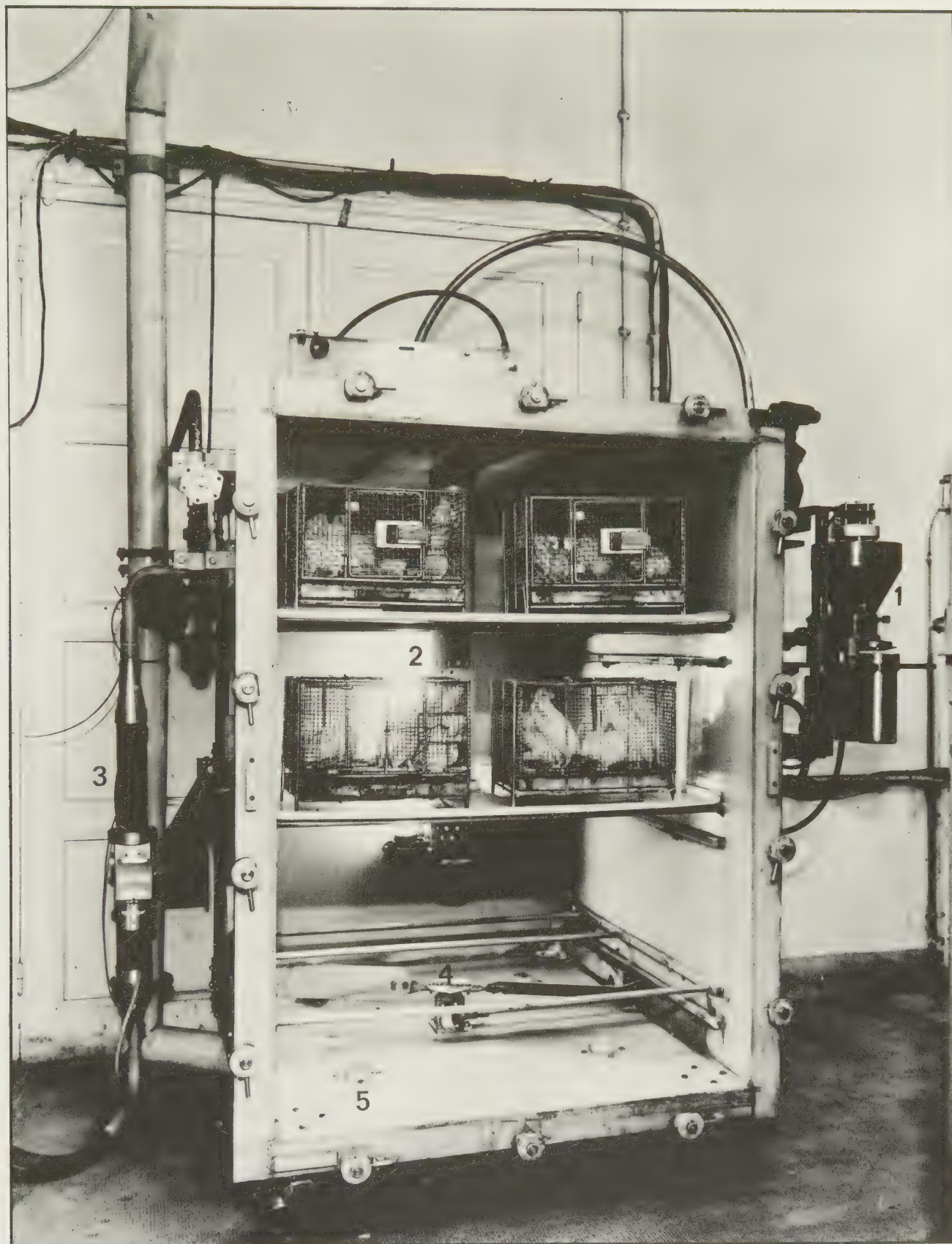


Fig.11 Matériel et cliché du centre d'Etude et de Recherche des Charbonnages de France - Service de Biologie dirigé par M. LE BOUFFANT.

l'empoussiérage a lieu dans une chambre dont l'alimentation continue en poussières est assurée par le sommet. La poussière est mise en suspension au moyen d'un distributeur à sole tournante assurant la production d'un aérosol de concentration constante dans le temps, un séparateur centrifuge souple est intercalé entre le distributeur et la chambre pour retenir les particules non respirables.

La concentration en poussières est contrôlée en nombre et en poids par des prélèvements sur membranes à micropores effectués au niveau des cages.

Les animaux soumis à cet empoussiérage demeurent cinq heures par jour pendant dix séances à la concentration de 300 mg/m^3 de Si O₂ (quartz) 98,5 % des poussières ont un diamètre inférieur à 5μ avec la distribution suivante : CHARBONIER, LE BOUFFANT (1960) [43] .

Taille des particules	Nombre en %
1 μ	61,5
1-2	23,7
2-4	12,7
4-6	1,8
6-10	0,3

Tableau I

III.6 - La méthode de détermination de la courbe d'épuration alvéolaire

Cette courbe est obtenue à partir de la mesure de l'activité du ⁵⁹Fe de l'hématite quel que soit le groupe animal étudié : Témoins, intoxication à la silice, intoxication au plutonium.

L'empoussiérage traceur à l'hématite est toujours pratiqué après l'aérosol de plutonium ou l'empoussiérage de silice, il permet de caractériser au moment de son administration les capacités d'épuration du tissu pulmonaire.

III.6.1. - Comptage des animaux

Les activités pulmonaires des animaux sont obtenues par comptage global quotidien des rats. L'hématite en effet est insoluble en milieu biologique et la rétention dans l'animal est la somme de l'activité pulmonaire et de l'activité intestinale en cours d'élimination.

Les rats sont placés dans une boîte de polyéthylène d'une longueur de 14 cm et d'un diamètre de 9 cm qui tourne devant un cristal d'iodure de sodium de 4 pouces/3 pouces, à la vitesse de 1 tour par minute - Fig.n°12



Fig.12 - Dispositif de comptage des rats

- Légende : 1 - Dispositif de contention des rats sous le cristal d'iodure de sodium
2 - Sélecteur 400 canaux
3 - Perforatrice

III.6.2. - Classement et utilisation des données

Les impulsions correspondant aux diverses classes d'énergies de photons émis par le cristal sont classées en 100 canaux par un sélecteur SA 40 et conservées en mémoire. Ces données correspondant au spectre d'émission du ^{59}Fe sont ensuite portées directement sur bandes perforées et transformées par la suite en cartes IBM. La mise en forme des résultats est réalisée après programmation par un ordinateur IBM. Trois programmes sont introduits :

- Un programme de sortie des données par jour
- Un programme pour obtenir l'évolution de ces données en fonction du temps, LEFEVRE (1969).
- Un programme d'analyse de l'évolution des données en fonction du temps par la théorie des compartiments : BAZIN et coll.(1968) [11].

Ce programme utilise la méthode de Monte-Carlo. Un modèle expérimental à N compartiments est choisi, dont chaque exponentielle sera caractérisée par un coefficient. Des coefficients sont tirés au hasard et les valeurs théoriques obtenues avec ces coefficients sont comparées aux valeurs expérimentales. Un indice de la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques est ainsi dégagé. Seules sont retenues les valeurs qui améliorent la précision de la courbe théorique. La répétition des tirages conduit par un processus de convergence à la solution cherchée. Si l'un des compartiments prévus par le modèle disparaît, le programme répartit les résultats, pourcentage et périodes de manière identique dans les compartiments restants. Ceci permet de tester la validité du modèle.

III.7 - Cathétérisme gastrooesophagien

La technique décrite par SPRITZER et al. (1964) [201] permet, à l'aide d'un cathéter posé à demeure dans l'oesophage, de recueillir les liquides déglutis continuellement par le rat. Les cellules, qui ont subi la remontée ciliaire le long des bronches ciliées puis de la trachée, arrivent au carrefour pharyngien, où la majorité d'entre elles sont projetées dans l'oesophage.

Les animaux mis à la diète depuis la veille sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de $0,15 \text{ cm}^3$ par 100 g, d'une solution à 2,5 % de Nembutal.

Le flanc gauche est rasé et incisé en position basse. L'estomac est dégagé et incisé sur la grande courbure dans la zone non digestive pour permettre l'introduction d'un cathéter de diamètre 210 terminé par une courte ampoule obtenue sur la flamme d'une veilleuse.

Le cathéter est passé de manière à franchir exactement le cardia. Une ligature souple est alors posée derrière l'ampoule de manière à maintenir le cathéter en place. Deux surjets enfouissants sont pratiqués autour de l'extrémité distale du cathéter et on termine par une ligature en bourse de manière à obturer l'ouverture gastrique. L'extrémité libre est alors poussée dans la partie supérieure du flanc de l'intérieur vers l'extérieur. Une incision en croix du tégument est pratiquée à ce niveau. La paroi musculopéritonéale est perforée et le cathéter extériorisé, un bouchon de polyéthylène est installé sur le cathéter et solidement fixé aux quatre pans dégagés dans la peau. Fig. n° 13.

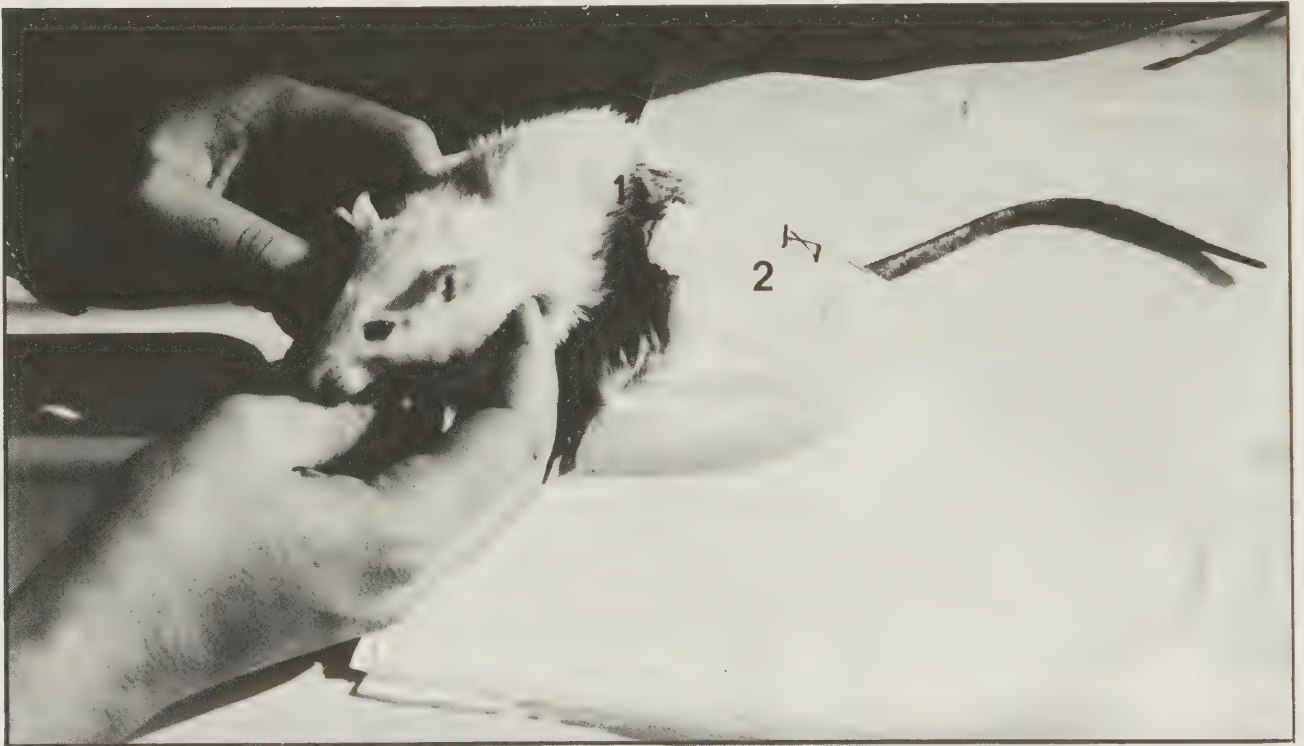


Fig.n° 13 - Cathétérisme à demeure gastrooesophagien

1/ Fixation du bouchon

2/ Flacon de polyéthylène où sont recueillis les liquides déglutis

Le flacon de polyéthylène est alors fixé sur son bouchon.

L'animal est maintenu en survie par des injections de solutions salées et glucosées isotoniques. Il peut boire à sa convenance et la déglutition des liquides entraîne les cellules et les sécrétions du carrefour pharyngien vers la bouteille de prélèvement. Très rapidement les animaux acquièrent le besoin quasi permanent de boire et les volumes recueillis dépassent 250 cm^3 par jour. La numération des cellules est pratiquée directement à l'hémocytomètre de Thoma.

Sur les animaux bien préparés, cette lecture des cellules totales excrétées ne pose pas de problème particulier car les liquides de déglutition sont limpides. L'identification des cellules par contre est difficile. Malgré la digestion mucolytique recommandée par SPRITZER et col. (1964) [201], la réalisation de frottis demeure délicate et l'aspect des cellules est très modifié. Ce point nous a conduit à adopter un protocole très différent. Les bouteilles sont remplies par de l'alcool éthylique à 95° jusqu'au $2/3$ de leur contenance. Les cellules sont ainsi fixées dès qu'elles atteignent le flacon. Des prélèvements aliquotes de 1 cm^3 sont alors filtrés sur "MILLIPORE" de porosité $0,8 \mu\text{m}$. Les filtres sont séchés et pesés. Des fragments de 5 mm de côté sont découpés et pesés. Ils sont transférés dans une solution alcool-acétique de Noir Amide.

Alcool méthylique	45
Acide acétique	10
Eau	45
Noir Amide	6 g

Les fragments sont laissés 5 minutes dans le Noir Amide puis rincés rapidement dans une solution de différenciation contenant :

Alcool méthylique	45
Eau	45
Acide acétique	10

Ils sont ensuite passés dans les bains suivants :

Eau : 30"	(Alcool éthylique	5 cm^3	1 minute
	(Ammoniaque	1 goutte	

(Alcool méthylique
(Eau
(Acide acétique

(1 passage - Alcool éthylique - 2 passages

Alcool propylique : 2 bains de 30" (Alcool propylique aa : minute
Benzène
Benzène : 1 minute

Les échantillons sont alors parfaitement transparents et montés dans l'huile d'immersion sous lamelle.

Cette coloration est très puissante et permet d'obtenir des caractéristiques morphologiques nettes sur des cellules en voie d'autolyse, ou peu colorables par les méthodes usuelles. Vtg. n° 14 - 15 - 16.

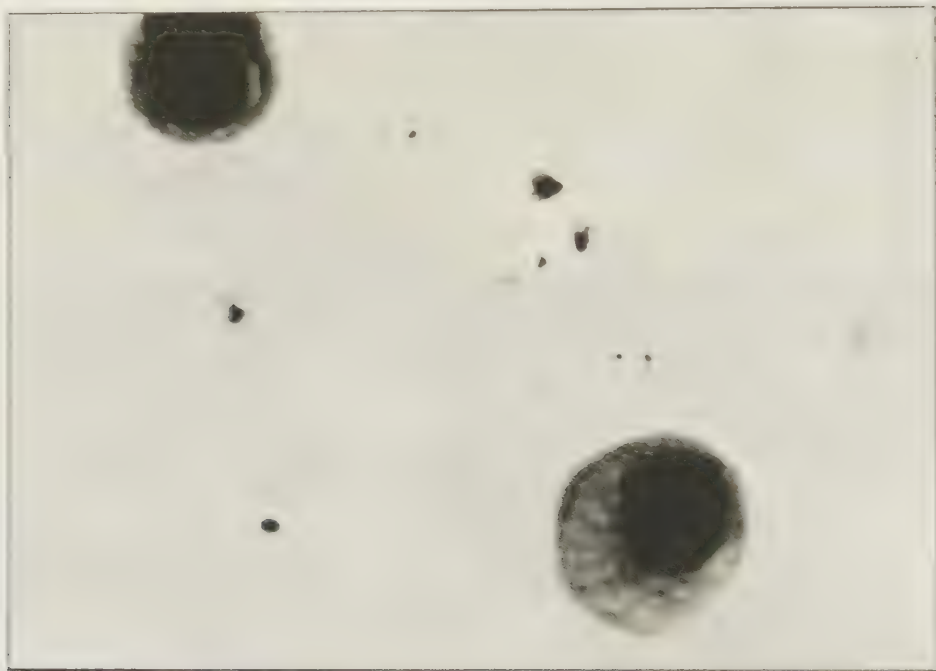


Fig. 14

Macrophage pulmonaire sur filtre millipore
Image de phagocytose dans la cellule en haut à gauche

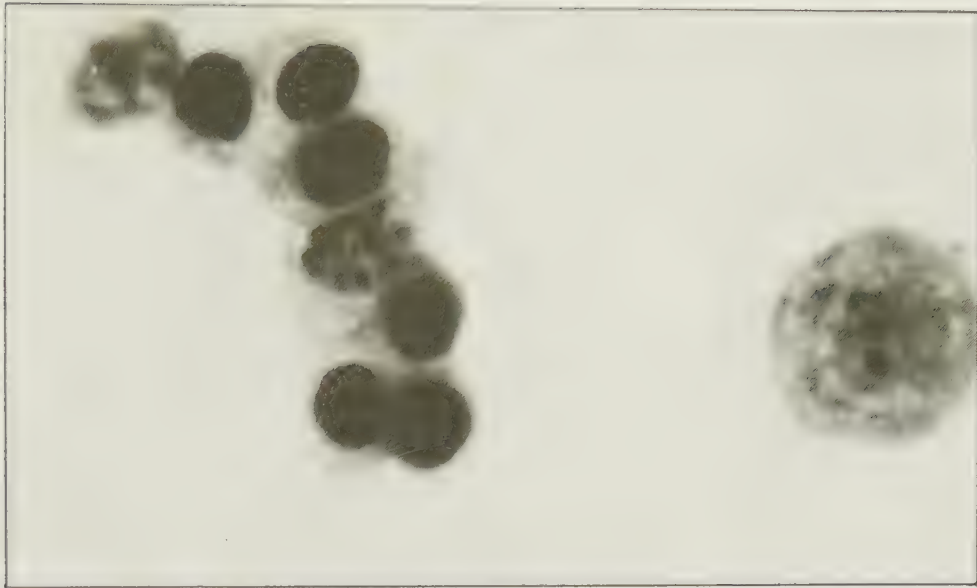


Fig. 15

Plaque de cellules non macropages retrouvées sur filtre millipore



Fig. 16

Cellule ciliée identifiée dans les liquides de déglutition

L'identification devient particulièrement aisée lorsque les cellules alvéolaires ont fixé des particules d'hématite qui ressortent en rouge sur le fond bleu dû à la coloration au Noir Amide.

III.8 - Parabiontes

Chez le rat, et spécialement dans les souches très consanguines, il est possible d'obtenir la cicatrisation homologue de tissus musculaires et tégumentaux. Plusieurs animaux peuvent être solidarisés et il se produit un échange plus ou moins important chez les partenaires des substances en solution dans le milieu intérieur.

III.8.1. - Technique chirurgicale

Les rats O.F.E. sont appariés en tenant compte de leur souche, de leur sexe et de leur poids. Après anesthésie au nembutal le côté du thorax et de l'abdomen, droit chez l'un des hôtes, gauche chez l'autre, sont soigneusement rasés. On dessine sur l'un des animaux le territoire cutané à exporter et on reporte sur le partenaire l'image symétrique la plus fidèle possible. L'image du lambeau cutané a la forme d'une raquette dont le manche arrive très en avant à proximité de l'épaule.

Certains des couples sont alors solidarisés à ce moment par suture très soignée du tégument : Points séparés à la soie n° 1 d'abord renforcée par des agrafes de Michel en avant et en dessous.

Pour les autres, la paroi abdominale est ponctionnée et découpée sous forme d'une rondelle d'environ 2 cm de diamètre. Afin d'éviter les complications mécaniques fréquentes occasionnées par le passage des anses intestinales dans l'anneau ainsi créé, les deux cavités sont isolées par un tamis de nylon à grosses mailles. Les parois abdominales sont alors suturées au travers du tamis par deux étages de suture au catgut n° 0.

On termine par une suture cutanée identique à celle décrite plus haut. La cicatrisation complète est obtenue après une dizaine de jours environ. Les animaux peuvent être maintenus en vie dans d'excellentes conditions. Fig.n° 17.

III.8.2. - Contrôle de l'état de parabiose

Le contrôle de l'état de parabiose est effectué par injection intraveineuse de ^{55}Fe .



Fig. N° 17 - Rats parabiontes après 10 mois de parabiose à coelome ouvert.

Quinze jours après l'intervention, les animaux testés reçoivent 1 μ Ci de ^{55}Fe dans la veine saphène sous forme de chlorure acide. On sait que dans ces conditions la plus grande partie du fer se trouve sous forme de complexe $\text{Fe } 3+$ avec la sidérophiline et qu'il n'existe pratiquement pas de fer dialysable. Trois heures après les animaux sont sacrifiés et on étudie la répartition du Fe radioactif par comptage au cristal Puits. Les résultats montrent que chez les animaux soudés par la peau seulement, l'activité plasmatique du receveur est égale à 3 % de celle de l'animal injecté. Chez les animaux greffés à coelome ouvert, cette valeur atteint 50 %. Dans les expériences qui nécessiteront la parabiose nous n'utiliserons donc que la dernière technique.

IV - RESULTATS EXPERIMENTAUX

IV.1 - Etude comparée de différentes méthodes d'extraction cellulaire

Les cellules libres de l'alvéole, nous l'avons vu, sont extraites par lavage endobronchique. Les animaux utilisés sont de lignée O.F.E. utilisée à l'état hétéroxénique. Ce sont des mâles pesant 230 ± 15 g et sacrifiés pendant le mois de novembre.

Les résultats sont exprimés en million de cellules extraites pour l'ensemble des poumons. Avec la technique de SPRITZER deux lavages sont pratiqués après incubation à 37° .

Douze rinçages consécutifs de 3 cm^3 à 22° suivis de massage du tissu sont pratiqués dans le cas de la technique de MYRVICK.

Douze rinçages également effectués avec 5 cm^3 de solution physiologique à 22° dans le cas de la technique de BRAIN, les valeurs obtenues représentent la moyenne de 15 rats par série.

	Moyenne	Ecart type
SPRITZER	2.28	1.31
BRAIN	5.41	0.88
MYRVICK	6.19	2.19

Tableau II

En ce qui concerne le nombre des cellules extraites, on voit donc que c'est la technique de massage tissulaire avec introduction intratrachéale de solution saline physiologique qui est la plus efficace.

Après avoir subi l'extraction selon SPRITZER les poumons sont soumis au rinçage avec sérum physiologique selon MYRVICK. Après cette opération on obtient $1,74 \pm 0,77 \times 10^6$ cellules. La somme de cellules obtenues est donc plus faible : $4,02 \times 10^6 \pm 1,21$ que lorsque le tissu est épuisé par la technique de MYRVICK seule. Si ce lavage est effectué à 37° avec le liquide nutritif de Hanks-tris à la lactalbumine, le nombre total de cellules obtenues est égal à $3,1 \times 10^6 \pm 1,14$.

IV.1.2. - Discussion

Il apparaît clairement que les résultats fournis par les trois méthodes d'extraction ne sont pas directement comparables. Parmi les facteurs influençant le rendement de l'opération, la nature du liquide de lavage semble le plus important. Ce résultat est en accord avec ceux de BRAIN (1970) [237], pour qui la présence d'ions alcalinoterreux, calcium et magnésium, conditionne l'adhérence des macrophages à la paroi. Il est en accord également avec les travaux expérimentaux de SANDERS (1970) [185], THOMPSON et coll. (1967) [206], METZGER et CASARETT (1967) [147] concernant l'influence du calcium sur la mobilité des cellules du péritoine. Dans le cas de l'incubation à 37° dans le liquide Hanks-tris à la lactalbumine, un nombre important de cellules demeure dans le tissu après lavage avec la solution physiologique (4,02 diffère de 3,1 très significativement $p \leq 0,01$).

Ce phénomène indique que l'incubation a augmenté l'adhérence entre les cellules et la paroi. Des cellules relativement mobilisables ont pu s'étaler et se fixer soit sur le cytoplasme des pneumocytes I, soit sur les cellules des canaux alvéolaires et des bronchioles respiratoires. La figure 18 en donne un exemple.

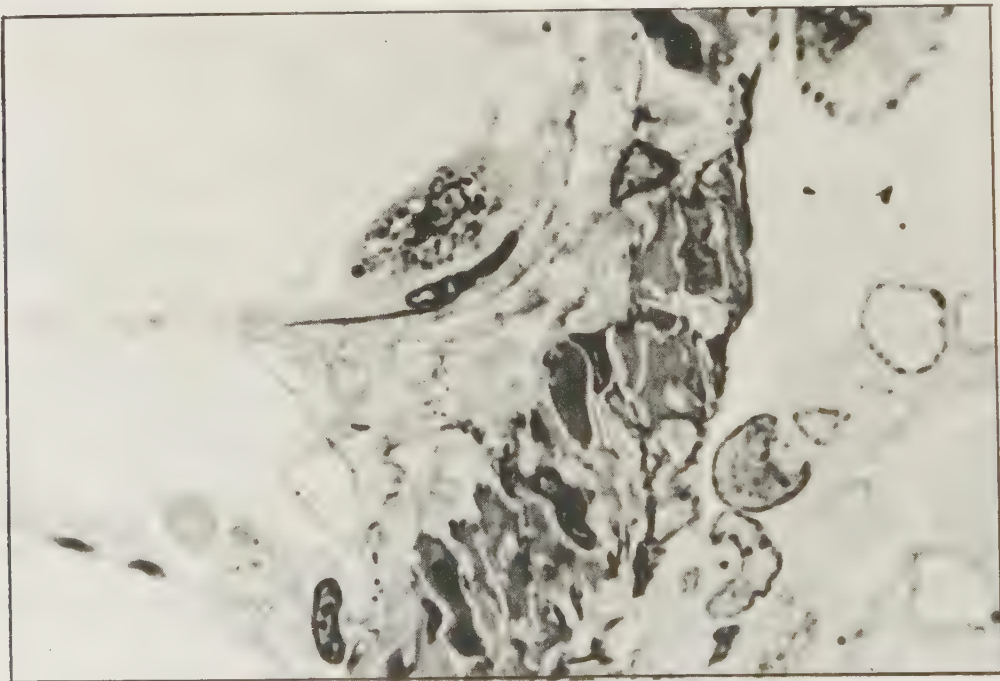


Fig.18

Macrophage chargé d'hématite installé sur un pneumocyte membraneux.
Coupe semi-fine colorée à l'Azur II

Des conditions comparables peuvent être rencontrées dans le poumon pathologique : après l'introduction de substances étrangères nocives dans le poumon, la première réaction est de caractère vasculaire ; POLICARD (1968) [169] insiste sur cette observation classique. Il s'ensuit une importante augmentation de poids du tissu et l'exsudation légère de liquide d'œdème. Dans ce milieu, les macrophages peuvent se fixer de manière comparable à celle observée lors du rinçage alvéolaire selon la méthode décrite par SPRITZER, et l'épuration alvéolaire peut en être modifiée.

Si la technique du massage pulmonaire est quantitativement intéressante, ce qu'avait déjà constaté BRAIN (1970) , cette méthode cependant paraît délicate à poursuivre pendant 12 cycles. Fréquemment le tissu se met à fuir et les volumes recueillis sont nettement plus faibles que ceux introduits dans le cathéter, ce qui augmente l'imprécision des valeurs moyennes.

Dans toute l'étude qui suivra nous utiliserons l'extraction par 12 rinçages successifs à la seringue sans massage du tissu.

IV.2 - Nature des cellules extraites

IV.2.1. - Microscopie optique

L'étude de ces cellules est effectuée sur frottis colorés à l'Eosine-Azur à des degrés variables selon la nature des animaux utilisés. On constate que la population obtenue est hétérogène. Certaines cellules n'ont jamais d'activité granulopexique dans l'alvéole. Ce sont :

a) - Des cellules lymphocytoïdes de différents types

Petits lymphocytes : ces cellules sont tout à fait comparables à celles du sang, le noyau est à chromatine en mottes très denses et le cytoplasme est réduit à un liserai très mince coloré en bleu.

Grands lymphocytes : Ils présentent la particularité d'avoir un noyau d'aspect le plus souvent foliacé avec une chromatine irrégulièrement répartie d'aspect peigné. Le cytoplasme est très pâle et homogène.

Ce caractère le distingue nettement du monocyte, dont on trouve quelques exemplaires parfaitement reconnaissables avec un noyau reniforme, voire également foliacé à chromatine peignée plus fine que dans le lymphocyte, et à cytoplasme gris pâle d'aspect très finement spumeux. Si cette cellule ne fixe pas de substances figurées minérales comme l'hématite que nous utilisons comme traceur de l'activité antixénique non spécifique, par contre les monocytes de l'alvéole englobent fréquemment des hématies présentes dans les premiers

prélèvements après lavage pulmonaire, en quantité plus ou moins importante, selon la qualité du lavage de la petite circulation. Ce caractère permet de les identifier avec certitude.

Cellules hyperbasophiles : Dans certains cas, elles peuvent représenter 1 à 2 % de la population alvéolaire extraite. Ce sont des cellules de tailles et de forme variables. Tantôt ce sont les cellules rondes d'un diamètre de 10 à 12 μ m avec un noyau à chromatine dense en mottes fines très nombreuses. Le cytoplasme est bleu violacé séparé en un point du noyau par un archoplasme souvent net: Figure n° 19.

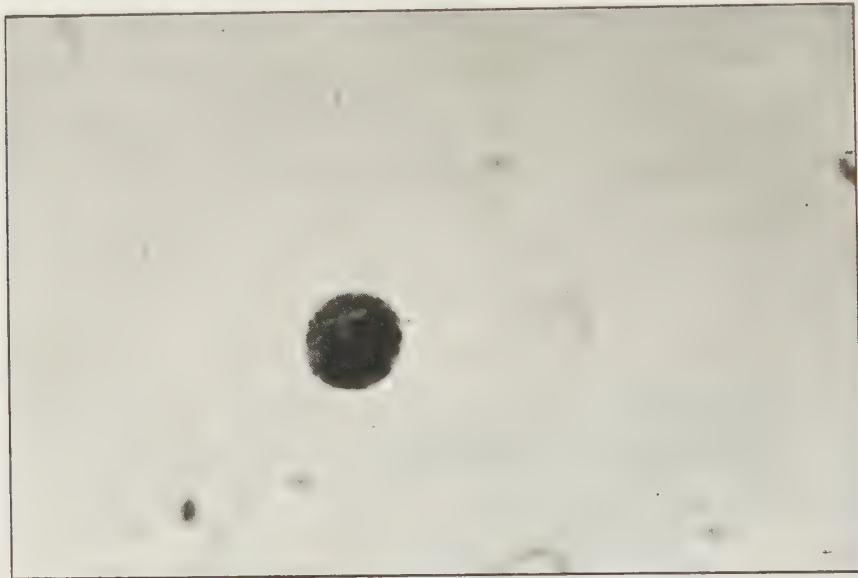


Fig. 19

Tantôt ce sont des cellules déformées plus grandes, dont les caractères de coloration nucléaire et cytoplasmique sont voisines de ceux des cellules précédentes, mais en général sans archoplasme. Figure n° 20.

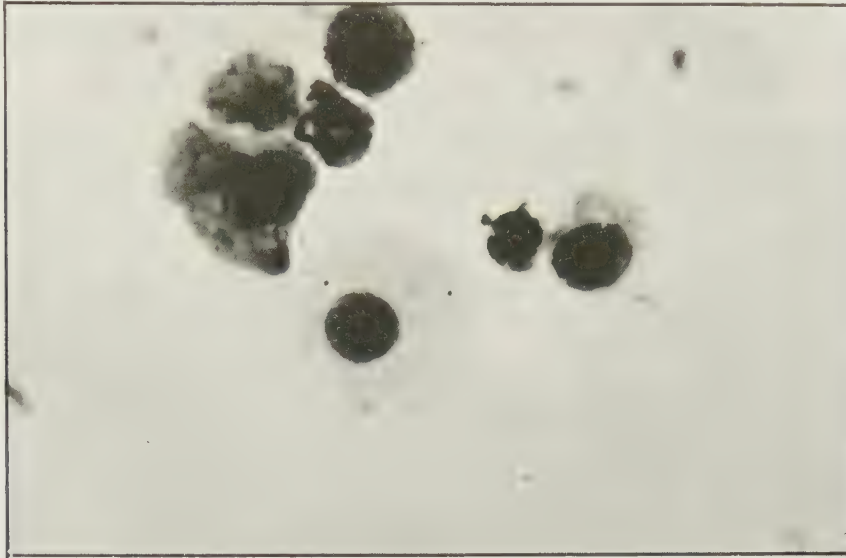


Fig. 20

b) - Des polynucléaires

Toutes ces cellules qui n'interviennent pas dans la granulopexie de l'hématite in vivo n'existent en quantité notable que chez le rat conventionnel et plus particulièrement à la fin de l'hiver lorsqu'apparaissent des épidémies importantes dans les élevages. Elles peuvent représenter pour les polynucléaires jusqu'à 5 % de la population totale sans qu'aucun autre signe pathologique puisse être noté sur les coupes histologiques. En ce qui concerne les cellules lymphocytiiformes, leur taux peut être extrêmement élevé et atteindre 30 à 50 % de la population. Ce sont essentiellement des lymphocytes foliacés. Ces cellules sont souvent plus nombreuses lorsque l'extraction est obtenue par la méthode du massage tissulaire. Dans ce cas, l'examen du tissu montre que les gaines péribronchiques et périartérielles, où se constituent chez l'animal conventionnel des nodules lymphatiques importants, apparaissent distendues et libres de cellules; une part non négligeable des lymphocytes recueillis peut donc provenir de cette origine.

En ce qui concerne les cellules hyperbasophiles elles sont comparables à celles que TANAKA (1957) [204] observe après une sollicitation antigénique. Des cellules de ce type ont été décrites dans le poumon par COLLET et coll. (1967) [49] lors d'infections expérimentales à Mycobacterium kansasii.

En dehors de ces cellules dont le caractère inflammatoire ne peut être nié, on trouve dans les liquides de lavage :

- des cellules ciliées : ces cellules d'origine bronchique ou trachéale ne posent aucun problème d'identification. Elles sont éliminées dès l'examen direct à la cellule de THOMA.

- de rares cellules non identifiées : en général à caractère proche des cellules endothéliales.

- des macrophages alvéolaires : ces cellules représentent plus de 95 % des cellules recueillies chez le rat S.P.F. et pratiquement 100 % des cellules obtenues chez l'animal Germ-Free compte non tenu des cellules ciliées.

Bien que tous les intermédiaires puissent être mis en évidence la morphologie de ces cellules permet de les classer dans différents groupes :

Groupe I :

Sur un frottis homogène la taille de ces cellules varie entre 8 et 11 μm . Le noyau est rond ou ovalaire à chromatine dense, quelques fois en mottes. Le cytoplasme est toujours visible, coloré en bleu gris et d'aspect toujours finement granuleux.

Groupe II :

La taille est comprise entre 11 et 16 μm . Le noyau est ovalaire ou rond, le plus souvent central, la chromatine de densité moyenne est répartie en petits grains, de manière homogène. Le cytoplasme gris à gris bleu, voire bleu franc est granuleux, très rarement vacuolaire.

Groupe III :

Les cellules sont de taille plus régulière, de 13 à 15 μm , et représentent le plus souvent un grand macrophage à échelle réduite. Le noyau est à chromatine dense, parfois pycnotique, le plus souvent excentré, déformé, et occupe un faible volume dans un cytoplasme pâle criblé de vacuoles.

- Grand macrophage : c'est une cellule rare de grande taille, supérieure à 18 μ m avec un faible rapport nucléocytoplasmique. Le cytoplasme est pâle et vacuolaire. La densité de la chromatine est variable.

Toutes ces cellules sont retrouvées en nombre variable dans le poumon des rats quelle qu'en soit l'origine et les conditions de vie. Elles sont caractérisées par leur activité granulopexique vis-à-vis des corps étrangers introduits dans l'alvéole.

IV.2.2. - Microscopie électronique

Nous prendrons le macrophage alvéolaire du rat Germ-Free comme élément de base pour notre description. Ce choix se justifie pour plusieurs raisons : contrairement au macrophage alvéolaire des rats conventionnels et S.P.F. qui a été abondamment décrit par différents auteurs, le macrophage du rat Germ-Free l'est encore relativement peu, LEAKE et HEISE (1967) [118], BAUER (1968) [107]. L'amélioration des techniques de fixation, HIRSCH, FEDORKO (1968) [94], peut permettre d'espérer des détails plus précis sur l'ultra-structure générale de ces cellules. En outre, le macrophage alvéolaire est une cellule placée directement dans le milieu extérieur. La variabilité de ce milieu, notamment en ce qui concerne les éléments bactériens, peut introduire un facteur de différenciation cellulaire que seule la comparaison avec l'état Germ-Free peut permettre d'apprécier avec certitude.

Aspect général

L'élément caractéristique du macrophage alvéolaire est l'apparente complexité des inclusions cytoplasmiques (Figure n° 21); cette apparence n'est donc pas limitée aux cellules vouées à la défense contre les corps bactériens.

Contrairement à ce que pourrait laisser croire l'examen des frottis, le noyau de ces cellules n'est que rarement ovalaire mais le plus souvent déformé par des incisures ou des replis profonds. L'aspect ovalaire est donc produit au cours de l'étalement des cellules sur frottis lorsque les cellules sont isolées rapidement après extraction par la solution physiologique, les villosités de la périphérie cellulaire sont rares (Figure n° 22).

Par contre, après extraction à 37° par du liquide de Mac-Coy enrichi avec sérum de veau, ces villosités peuvent être très nombreuses et sont vraisemblablement en rapport avec la pinocytose des protéines, KARRER (1958,1960) [102] , [103].

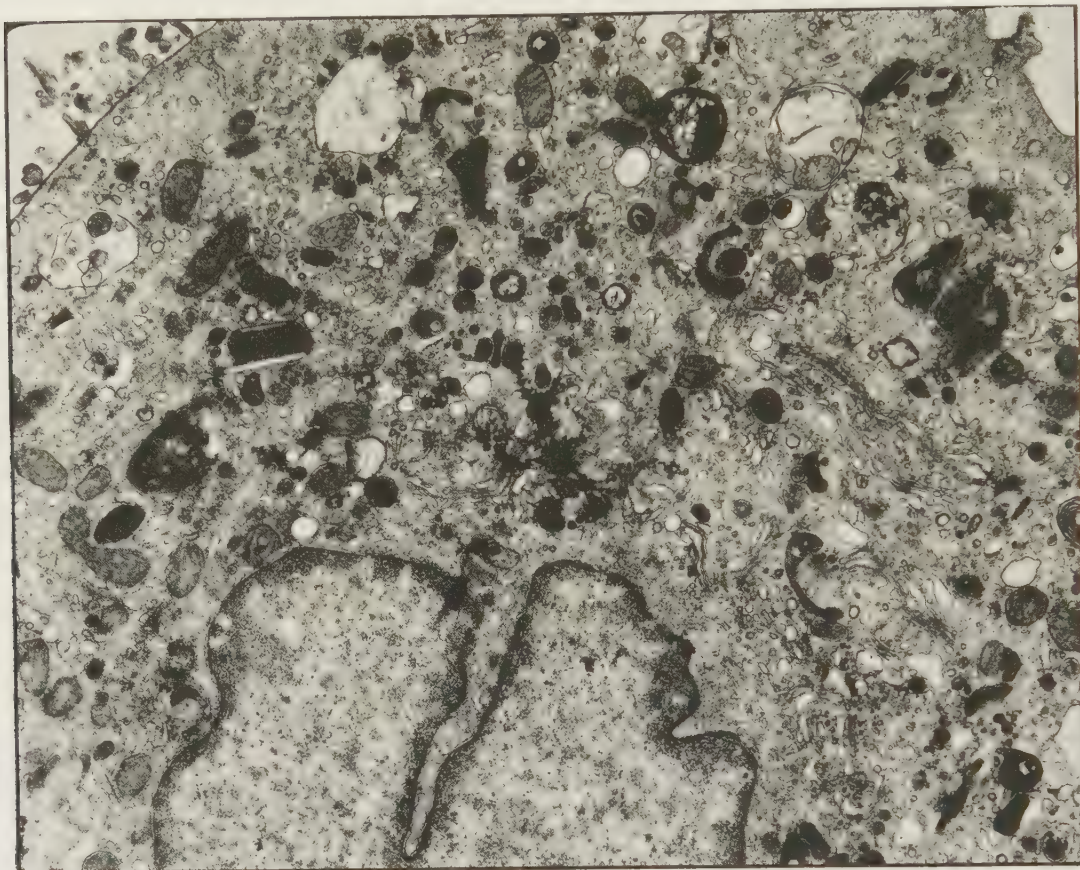


Fig.21

Grossissement 12.950 - Noter l'aspect complexe du cytoplasme dû à la multiplication des corps denses simples ou composites et à de nombreuses vacuoles de pinocytose.

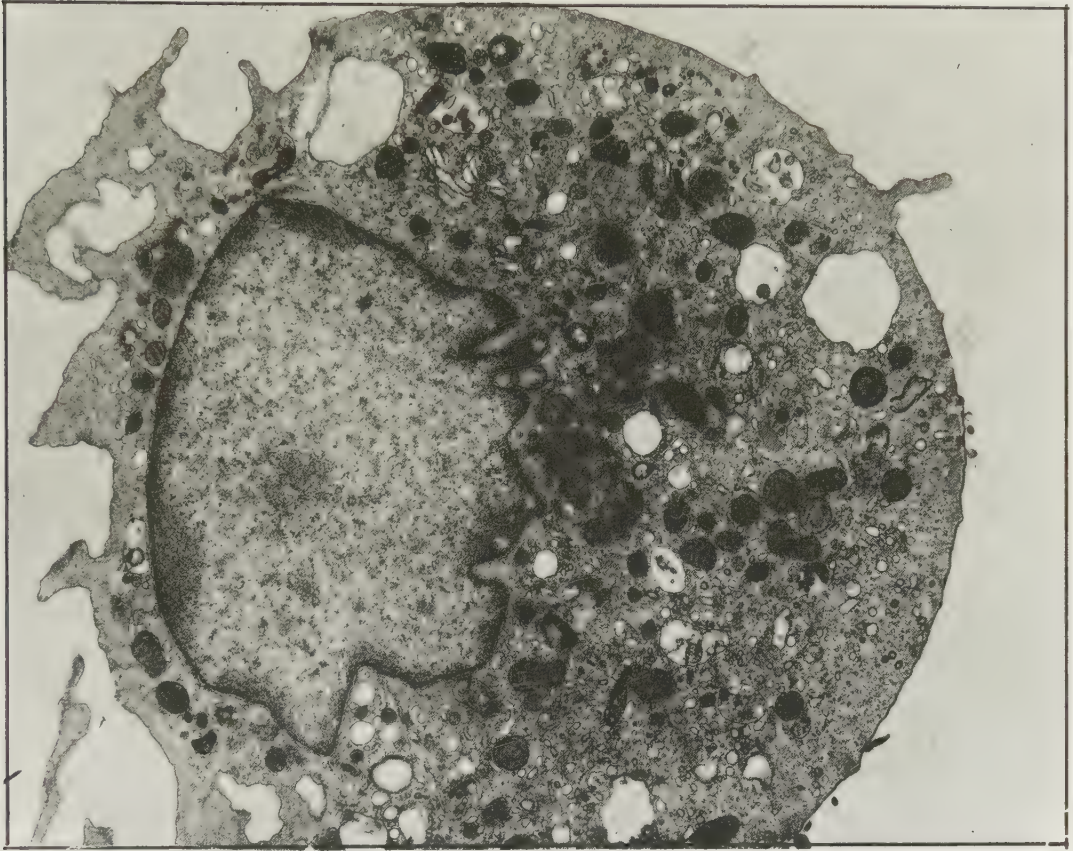


Fig.22

Grossissement 10.950 - Cellule isolée en milieu pauvre
Noter l'absence de microvillosités

Noyau : la répartition de la chromatine est le plus souvent marginale, (Figure n°23), mais la substance nucléaire centrale conserve une apparente densité, liée à la dispersion de nombreux petits foyers granuleux. Cette répartition s'oppose à celle du lymphocyte par exemple (Figure n° 24) obtenu sur un animal conventionnel. A l'aspect en motte de la microscopie optique correspond cet aspect multifocal confluent de la chromatine. Le nucléole est toujours très visible et d'aspect filamenteux intercinétique le plus souvent.



Fig.23

Grossissement 17.400

La chromatine du noyau est plus dense contre la membrane nucléaire

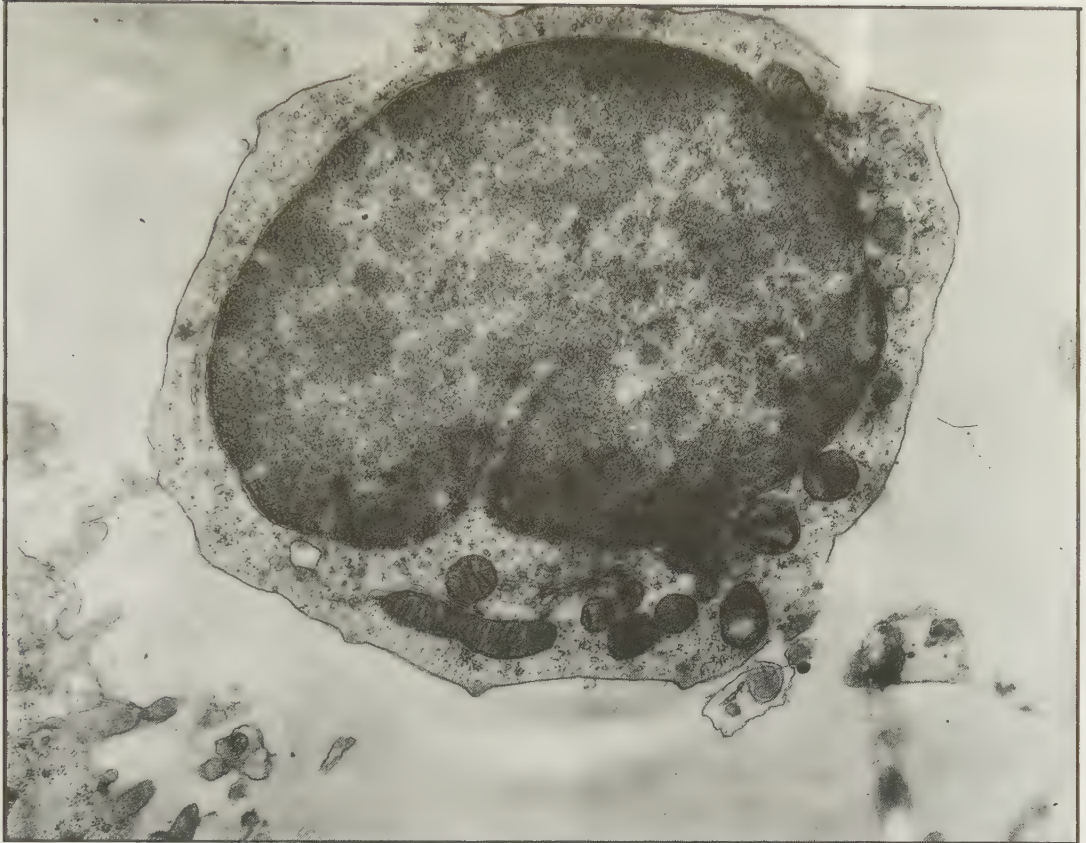


Fig.24

Grossissement 17.400

Lymphocyte

Centre cellulaire : Ainsi que le remarquent COLLET et coll. (1966) [50] chez le rat conventionnel, le centre cellulaire du macrophage alvéolaire est toujours très étendu. Il possède un diplosome régulier et un complexe de Golgi développé composé essentiellement de vésicules de densité variable (Figure n° 25).

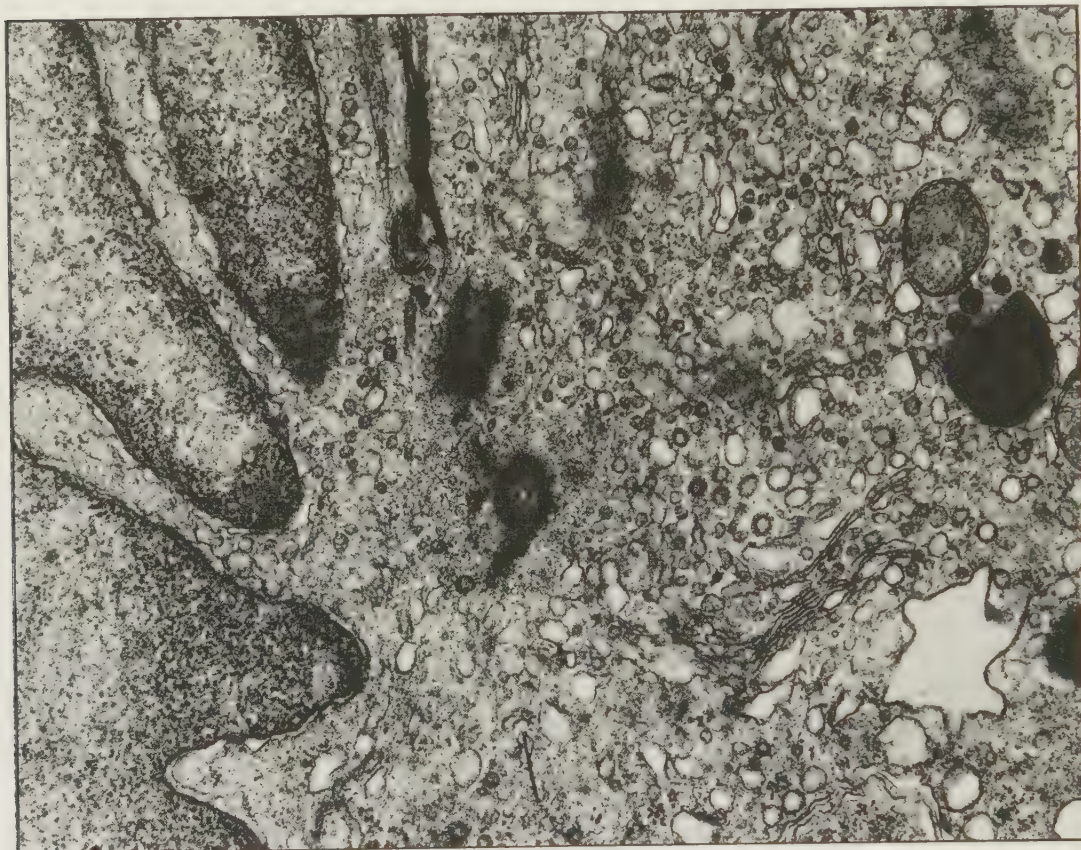


Fig.25

Grossissement 32.800

Aspect du centre cellulaire

Mitochondries :

Elles sont de taille assez constante, en général inférieure à $0,5\mu\text{m}$ mais de forme et de densité très variables. Fig. 26 - Fig. 27 Fig. 28.

Fréquemment, comme dans la Fig. 26, les crêtes apparaissent altérées ou groupées de manière anormale.

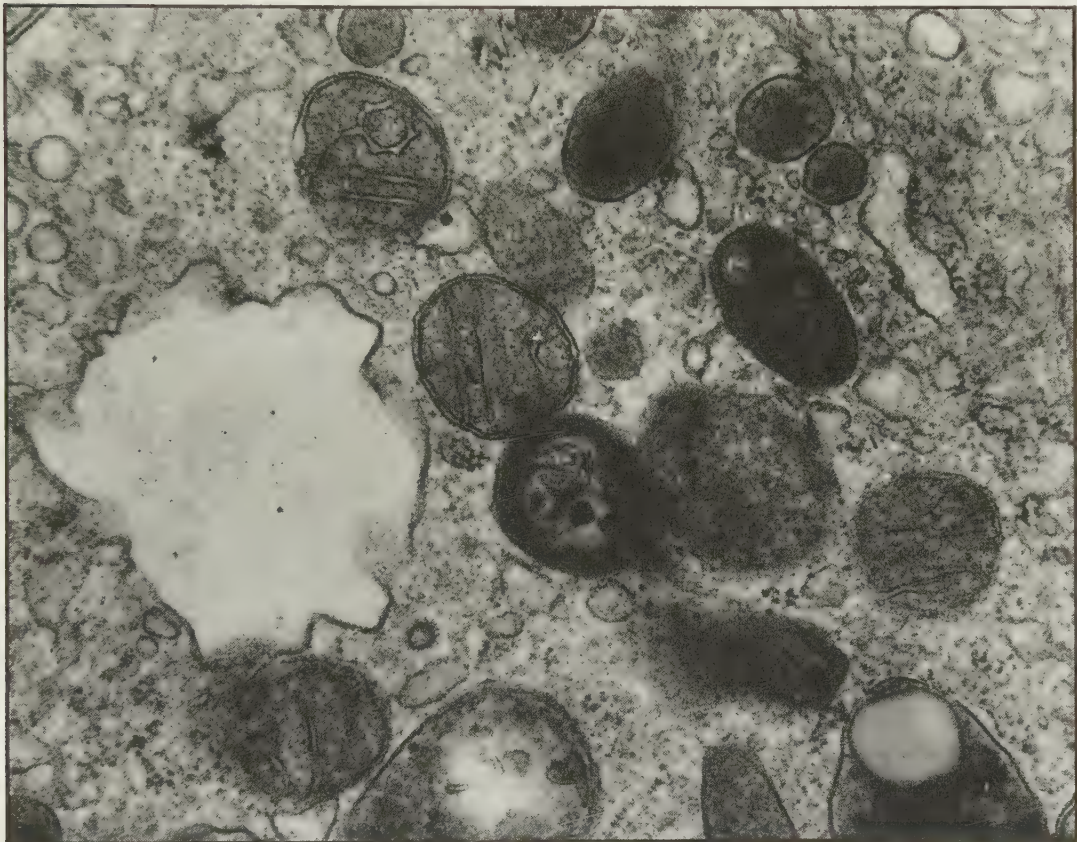


Fig.26

Grossissement 51.100

Mitochondries dont les crêtes sont groupées de manière irrégulière. Noter l'effacement des membranes



Fig.27 - Grossissement 40.000 - Mitochondries à matrice dense

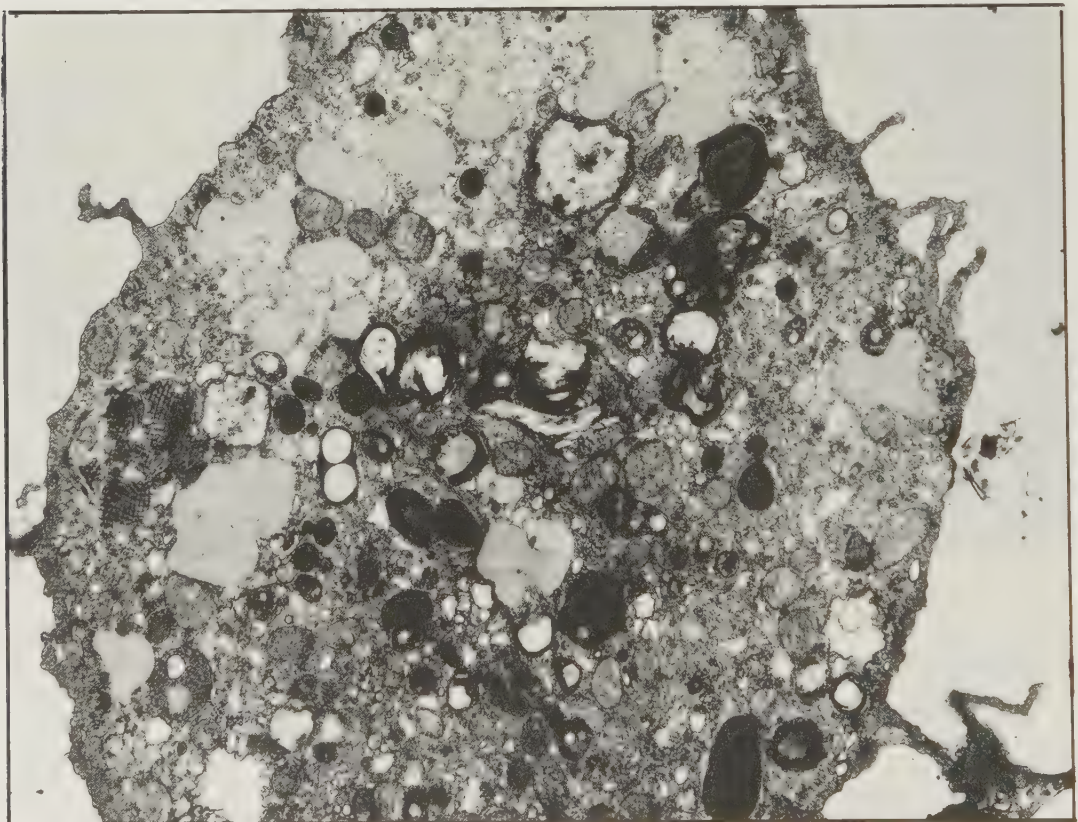


Fig.28 - Grossissement 12.950 - Mitochondries à matrice claire.
Noter en outre l'abondance des vacuoles grises et la complexité des inclusions denses comportant une image en damier à gauche.

Reticulum endoplasmique

Il est essentiellement constitué par la variété lisse, par place et en général à la périphérie cellulaire quelques éléments du reticulum rugueux sont reconnaissables - Fig. N° 29.

Les ribosomes isolés sont par contre souvent nombreux.

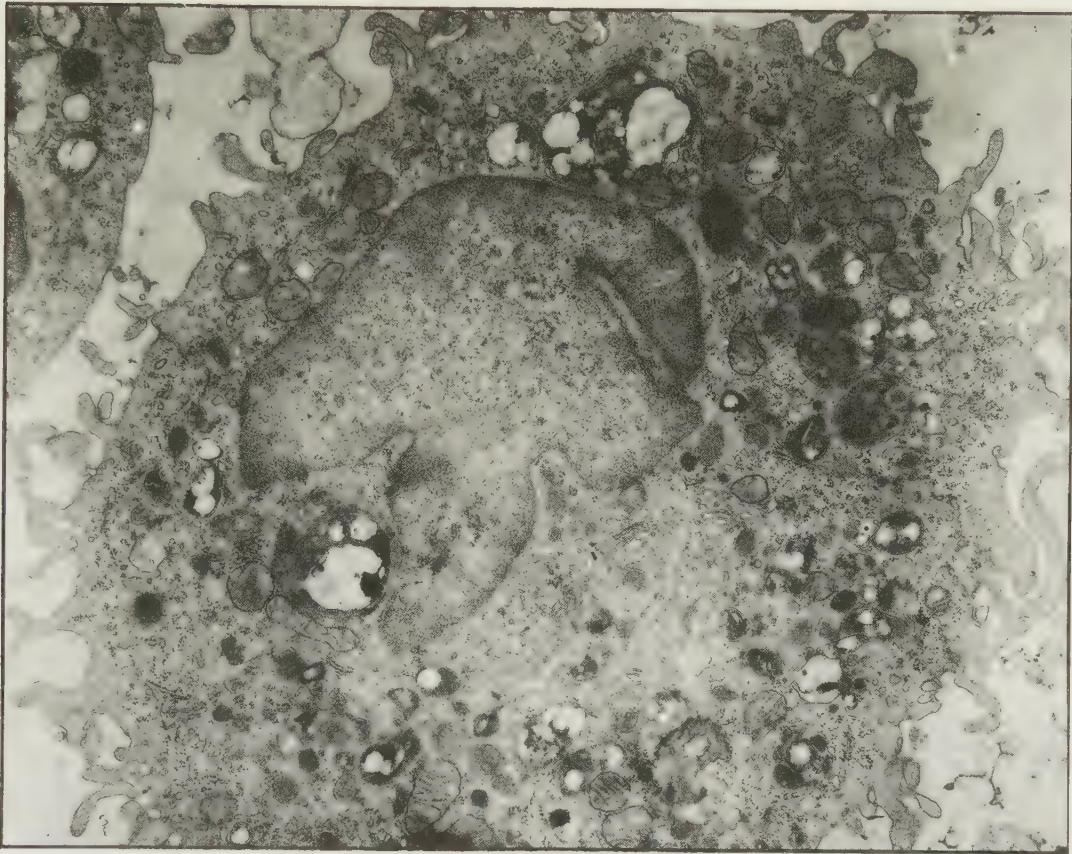


Fig.29

Grossissement 13.200 - Ribosomes isolés et réticulum granuleux à la périphérie cellulaire

Microfilaments :

Ces éléments de l'ultrastructure cellulaire sont particulièrement bien mis en évidence après fixation par le mélange de HIRSCH et FEDORKO, Fig. N° 30, parfois des structures filamenteuses apparaissent particulièrement denses, Fig. N° 31.

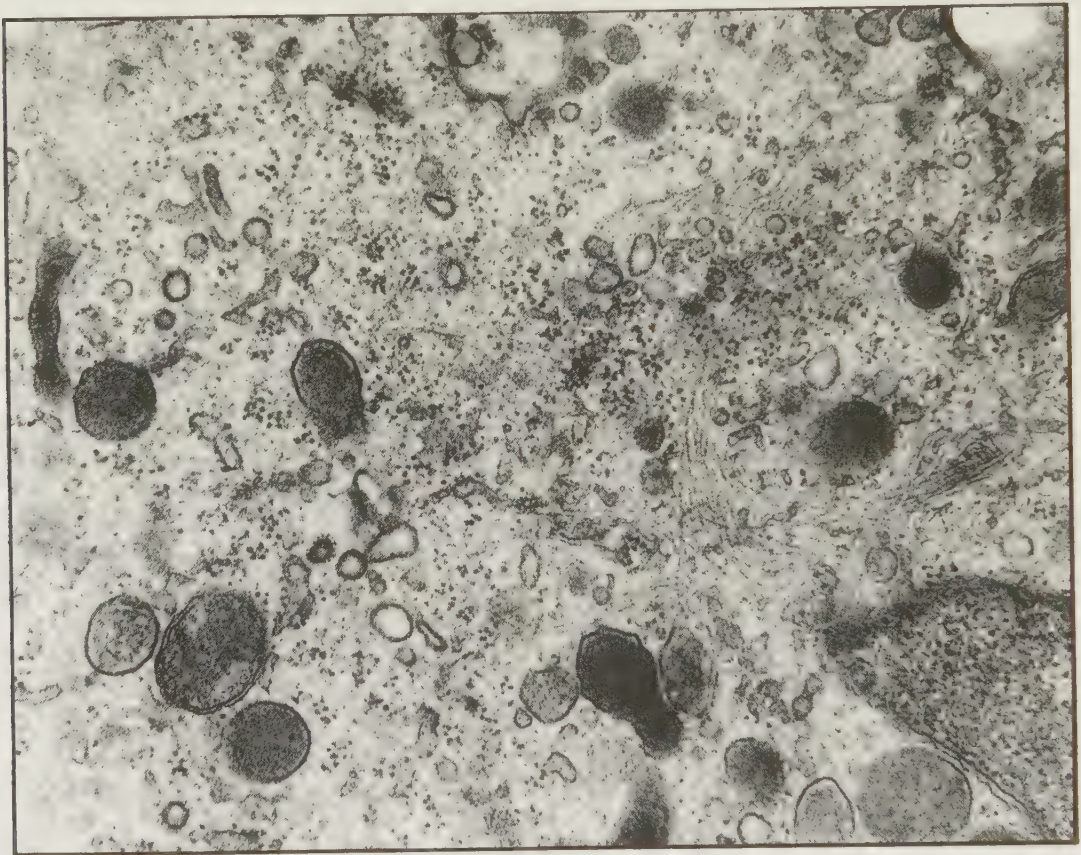


Fig.30 - Grossissement 40.000 - Réseau de microfilaments

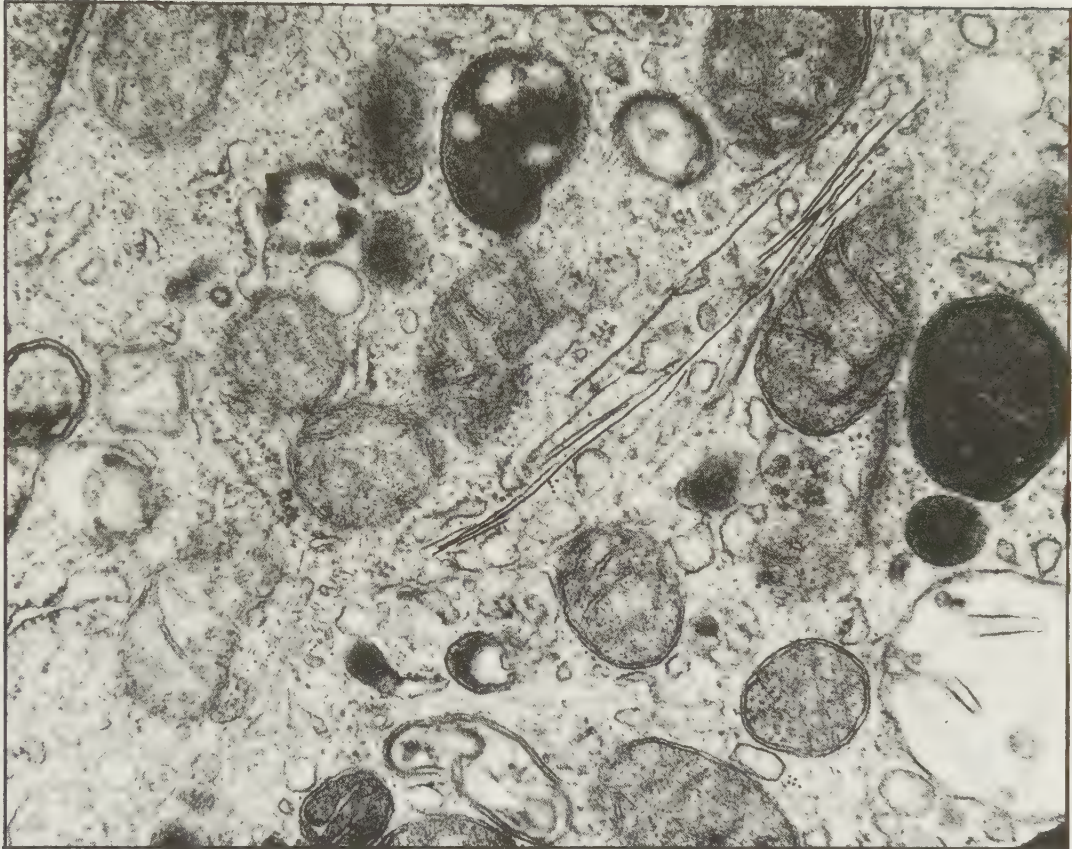


Fig.31 - Grossissement 40.000 - Microfilaments denses

Inclusions cytoplasmiques

Certaines inclusions n'ont pas de caractère spécifique, ce sont des vacuoles graisseuses à contenu partiellement extrait qui apparaissent gris homogène après coloration - Fig. 28 et 32.

A côté de ces vacuoles existent de nombreuses inclusions de figures myéliniques en écaille - Fig. 8 et 33, ou plus rarement damier - Fig. 28 et 34.

A côté de ces formations existent de petites inclusions denses interprétées comme des lysosomes, COLLET et al. (1966) [50] Fig. N° 35. Ces corps denses peuvent former par coalescence ou par fusion avec des vacuoles de phagocytose, ou des vacuoles autophagiques, COHN et Coll. (1965) [47], des lysosomes secondaires dont les résidus donnent des images composites : post lysosomes fig. 36 - 37 - 38. Certaines formations qui sont vraisemblablement de même origine paraissent plus difficiles à interpréter fig. N° 36 et 39.

Elles apparaissent soit sous forme tubulaire contenant au centre un ou plusieurs éléments plus denses, soit sous forme de membranes dessinant des arabesques où s'emprisonnent des fragments hyaloplasmiques. Ces images sont comparables à celle que FEDORKO et Coll. (1968) [65] observent après intoxication par la chloroquine.

Très fréquemment des inclusions rappelant la phagocytose de cristaux sont observées dans les macrophages alvéolaires, MARTIN et al. (1971) [137] ont pu montrer que de nombreuses analogies existaient entre les inclusions tubulaires décrites plus haut, les images cristallines de la fig. 38 et la phagocytose expérimentale de cristaux de cholestérol in vitro.

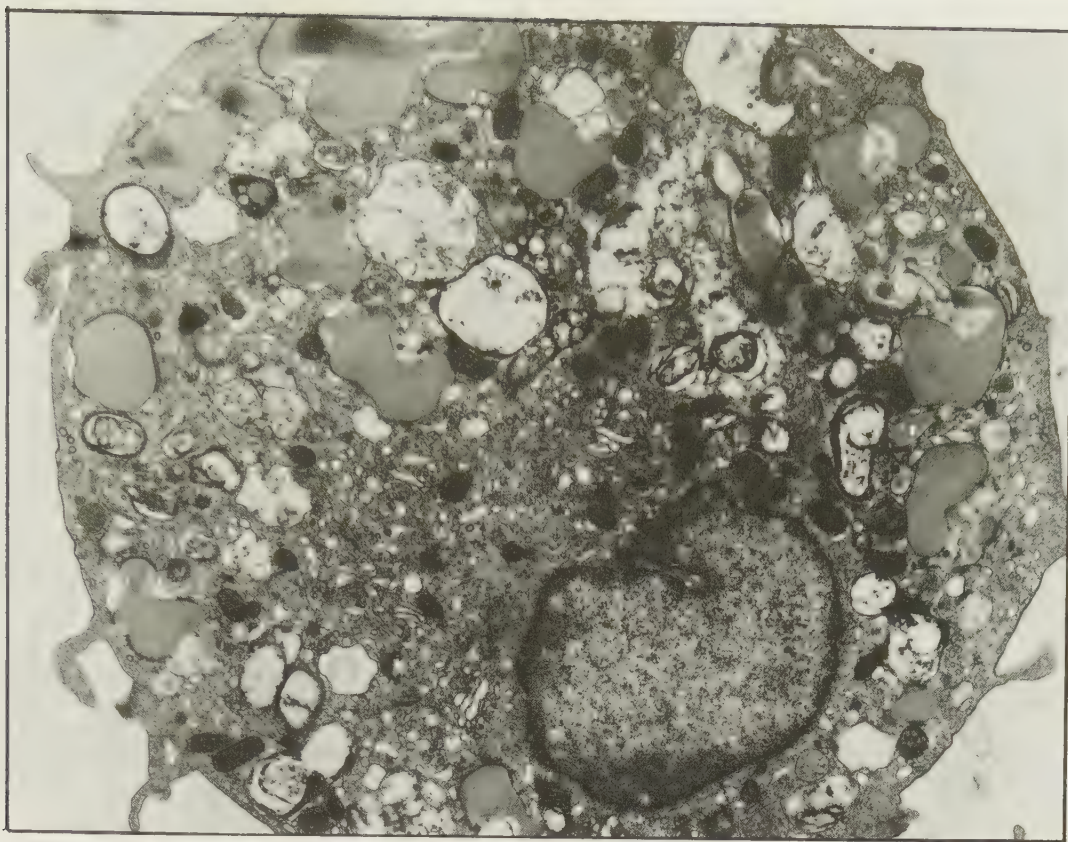


Fig.32 - Grossissement 10.950 - Vacuoles graisseuses



Fig.33 - Grossissement 17.400 - Corps en écaille

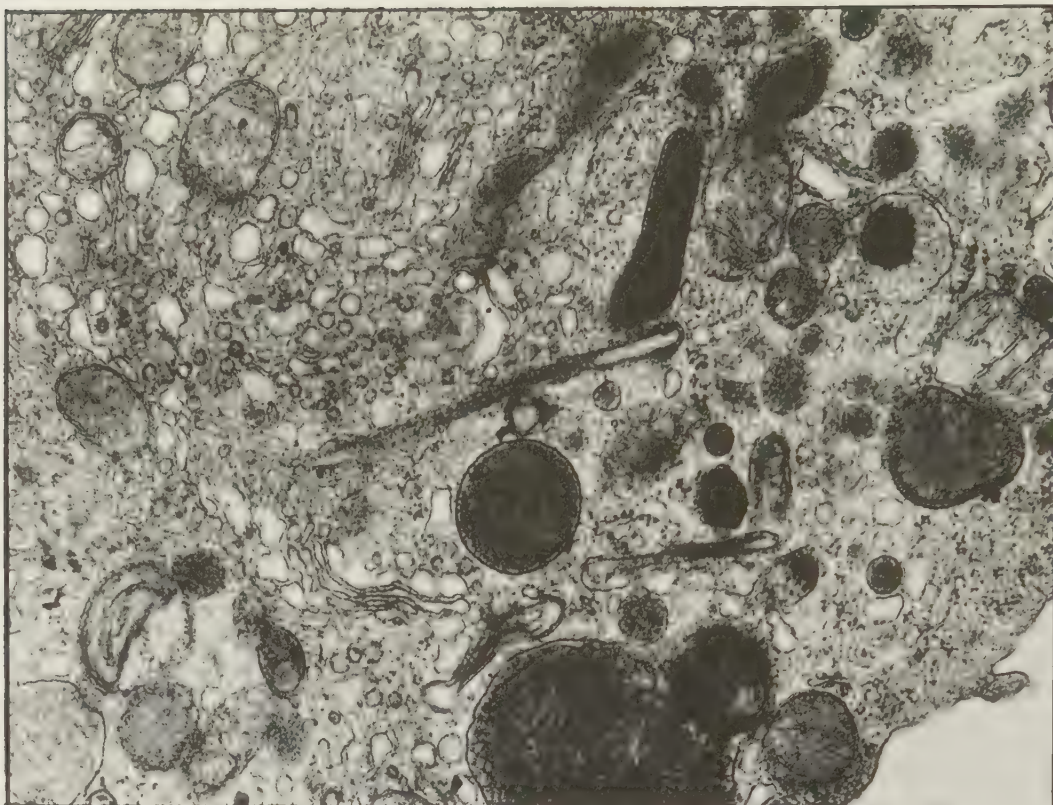


Fig.34 - Grossissement 32.800 - Corps en damier

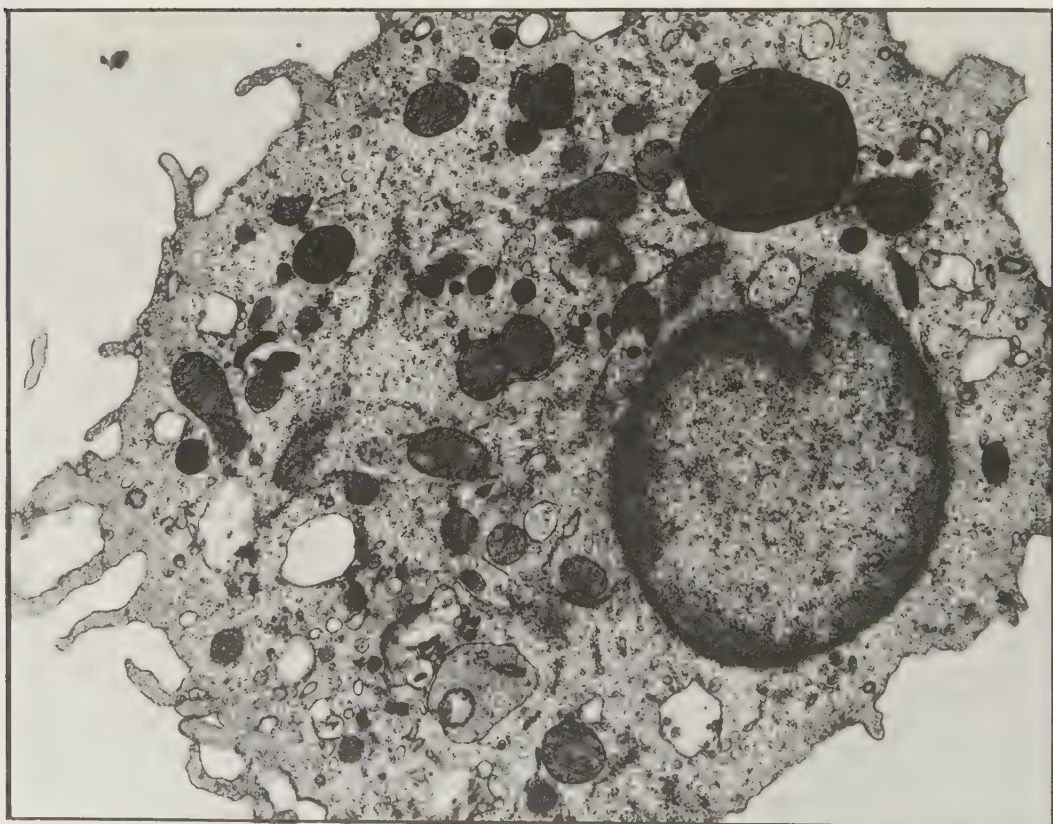


Fig.35 - Grossissement 16.400 - Corps dense à feuillets serrés

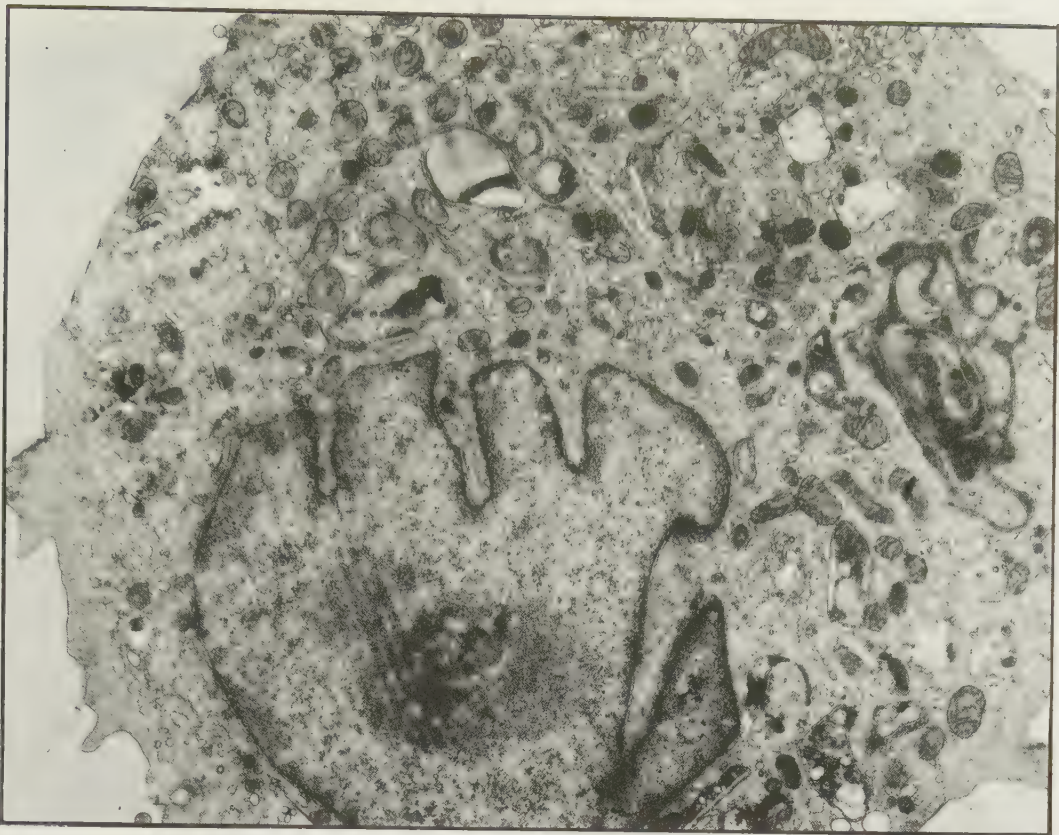


Fig.36 - Grossissement 10.950 - Inclusions composites évoquant des images de sequestration

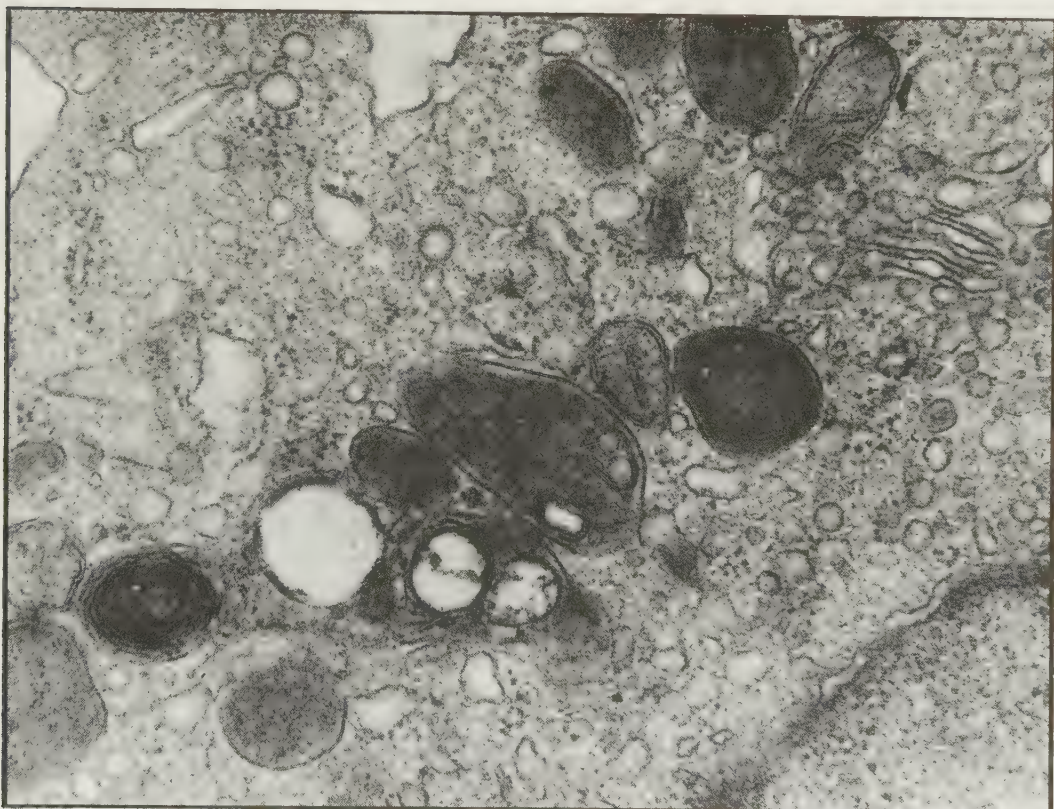


Fig.37 - Grossissement 51.100 - Formation de figures pseudomyéliniques



Fig.38 - Grossissement 40.000 - Images évoquant la dissolution de cristaux

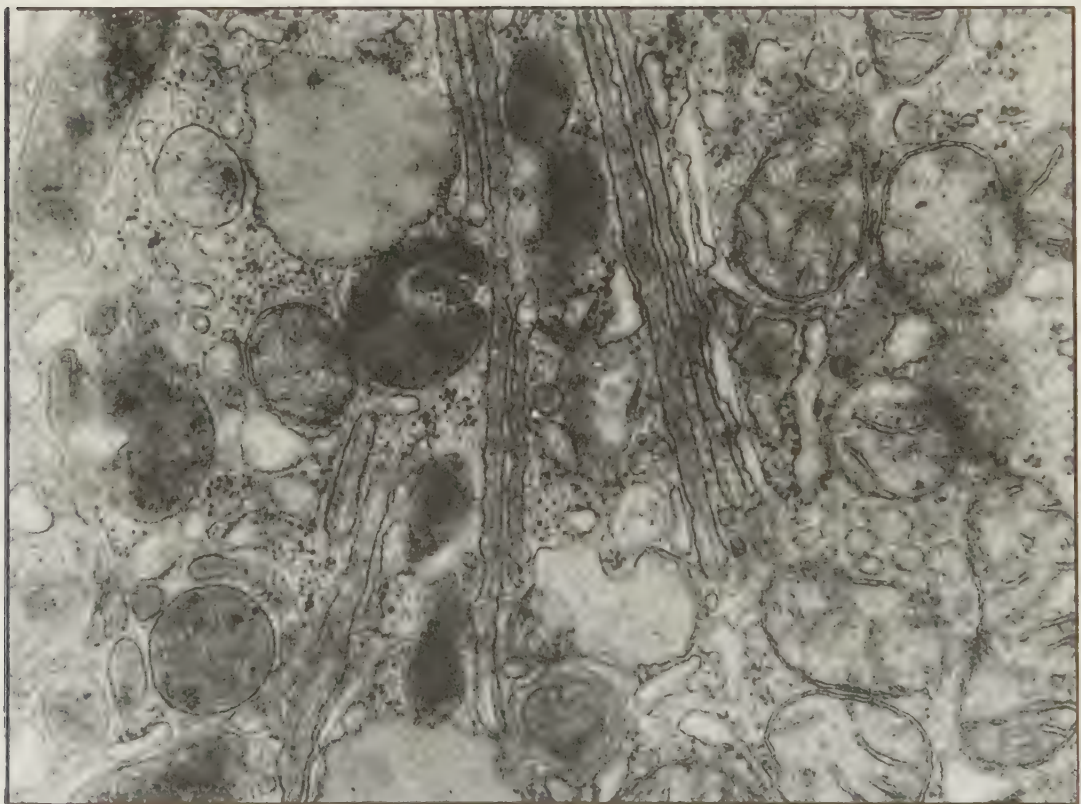


Fig.39 - Grossissement 40.000 - Pseudotubules cytoplasmiques

Discussion :

Certains des caractères de classification retenus pour les cellules observées sur frottis ne sont pas confirmés par la microscopie électronique. En fait, dans les différents types de macrophages alvéolaires seule la distinction entre cellules vacuolaires et cellules non vacuolaires pourrait correspondre à deux classes cellulaires différentes. Cette distinction avait déjà été proposée par BERTALANFFY (1964) [157] qui a établi à partir de ce critère une lignée cellulaire aux caractéristiques de renouvellement particulières.

Les grandes cellules vacuolaires sont rares chez l'animal Germ-Free, toutefois dans la lignée que nous avons observée les cellules à inclusion lipidiques homogènes sont relativement nombreuses contrairement aux observations de LEAKE et HEISE (1967) [118]; Fig. 28 - 32.

La classification des macrophages pourrait donc se résumer de la manière suivante :

1°) - Groupe I et Groupe II

2°) - Groupe III et grand macrophage

La basophilie du cytoplasme observée ne correspond pas à une variation de la teneur en réticulum granuleux mais à une augmentation des ribosomes libres.

A l'exception de quelques cellules bronchiques la microscopie électronique confirme l'homogénéité de la population recueillie par lavage pulmonaire. Les cellules lymphocytiiformes ne sont observées que chez l'animal conventionnel et à un moindre degré chez l'animal S.P.F.

En ce qui concerne les différences entre les cellules du Germ-Free et celles du S.P.F. ou du conventionnel, comme l'ont remarqué BAUER et coll. (1966) [9] puis LEAKE et HEISE (1967) [118], BAUER (1968) [10] très peu de points caractéristiques peuvent être retenus : La donnée la plus significative cependant semble être la fréquence d'altérations mitochondriales, fig. 26, 27, 28. Ce point a déjà été observé par NAKAO et MAO (1966) [155] pour les cellules intestinales du rat Germ-Free.

Dans le groupe d'animaux que nous avons étudiés, l'un des éléments frappants a été la fréquence de structures tubulaires ou membranaires complexes, Fig. 36 et 39. Certains éléments se rapprochent des structures décrites par MATTER et coll. (1968) [139] pour la "micropinocytosis vermiformis". Toutefois, l'organisation les rapproche plus des vacuoles autophagiques et nous n'avons jamais vu la continuité des tubules avec la membrane cellulaire. Bien que de nombreux aspects voisins aient été observés chez le rat non Germ-Free, la fréquence et l'intensité de ce phénomène paraît significative du groupe que nous avons étudié.

Le rapprochement que MARTIN et coll. (1971) proposent avec la phagocytose de cristaux de cholestérol est intéressant, il pourrait indiquer une modification du métabolisme lipidique chez le Germ-Free qui pourrait rendre compte également des troubles de l'organisation des crêtes mitochondriales et de la multiplicité des structures de membranes proches des vacuoles autophagiques.

En dehors de ces détails d'ultrastructure, la donnée essentielle de la comparaison des états conventionnels pathogène Free et Germ-Free réside dans l'homogénéité des populations alvéolaires.

Ce résultat apparaît particulièrement sur le tableau suivant, résultant des données en microscopie optique sur frottis compte non tenu des cellules ciliées. Résultats obtenus en Avril 1969 exprimant le nombre de cellules des différentes classes pour 100 cellules comptées.

TABLEAU 3.

Résultats des données en microscopie optique sur frottis
compte non tenu des cellules ciliées

	macrophages				non macrophages		
	Gr.1	Gr.2	Gr.3	grand macro.	poly.	lympho.	mono.
Rat conventionel	7.7	49.4	20.1	0.9	4.2	17.1	0.8
Rat S.P.F.	17.6	63.9	13.3	1.4	0.2	3.6	0
Rat Germ-Free	9.7	81.5	6.4	1.2	0.7	0.6	0

IV.3 - Etude de l'influence de la lignée, de l'état de contamination bactérienne, du sexe et de la saison sur la population de macrophages alvéolaires.

De nombreux facteurs modifiant le nombre des cellules extraites ont été analysés par BRAIN et FRANCK (1968) (247). Toutefois certains facteurs importants n'ont pas été mis en évidence : la saison, le sexe, la lignée et l'état de contamination bactérienne. Dans cette étude nous nous sommes efforcés d'en déterminer l'importance. Les résultats ci-dessous ont été obtenus sur des rats mâles de même poids $230 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ avec la technique de BRAIN.

Les chiffres présentés expriment le nombre de macrophages extraits. Ces valeurs sont calculées après avoir déterminé sur frottis le pourcentage de macrophages dans la population totale.

Résultats :

1° - Influence de la lignée et de l'état microbiologique :

Les résultats figurent dans le tableau 4 où les valeurs supérieures représentent la moyenne et les valeurs inférieures l'écart type.

L'étude statistique par le test de Student effectué sur les différentes moyennes des populations après vérification du mode de répartition des valeurs conduit aux résultats suivants :

A	-	B	:	P	$\leq 0,2$
B	-	C	:	P	$\leq 0,01$
C	-	D	:	P	$\leq 0,01$
B	-	C	:	P	$\leq 0,05$

En ce qui concerne le groupe E, il est différent de tous les autres de manière hautement significative

2° - Etude de l'influence de la saison et du sexe (Tableau 5)

L'étude statistique montre que les moyennes diffèrent dans les conditions suivantes :

TABLEAU 4

	Holoxénique.		Heteroxénique.		Axénique.	
	N.A.	N.macro./ 10^6	N.A.	N.macro./ 10^6	N.A.	N.macro./ 10^6
Wistar	20	7.21 4.32 A	15	5.41 0.88 B		
Fischer			12	4.12 1.07 C	8	2.54 0.43 E
Sprague-Dowley			24	6.37 1.59 D		

F	-	G	:	p	≤	0,01
J	-	L	:	p	≤	0,1
H	-	K	:	p	≤	0,1

D'autre part les groupes H ou K comparés à tous les autres groupes sont très significativement différents.

IV.3.2. - Discussion, conclusions :

Tous les facteurs que nous avons mesurés, la lignée, l'état microbiologique, la saison et de manière moins nette le sexe, peuvent être considérés comme des paramètres modifiant la population alvéolaire. Il faut également noter que bien qu'il n'y ait pas de différence très significative entre l'état holoxénique et l'état hétéroxénique, la dispersion des résultats est beaucoup plus importante chez les animaux conventionnels que chez les animaux S.P.F. ; cet état de fait est traduit par l'écart type.

En ce qui concerne le sexe, nous remarquerons que nos résultats vont dans le même sens que ceux observés par SIMNETT et HEPPLESTON (1966) [193] sur les tissus du poumon de souris en utilisant le test de blocage des mitoses par la colchicine. Le nombre de cellules en mitose est plus élevé, dans le cas des femelles, que dans celui des mâles. Ces résultats rappellent ceux de BULLOUGH (1955) [32] qui observe que l'addition d'oestrone augmente le nombre des mitoses de l'épiderme de souris maintenu en culture. L'influence de la saison est particulièrement nette. Cependant l'expérience décisive qui aurait consisté à étudier cette influence sur les animaux Germ-free n'a malheureusement pas pu être réalisée par suite de la perte de l'élevage.

Compte-tenu de ce que nous observons néanmoins entre les animaux holoxéniques et hétéroxéniques l'hiver, nous pouvons penser qu'une modification de l'état microbiologique de l'alvéole n'est pas le seul facteur qui puisse être suspecté dans ce phénomène. Il est à noter en outre que le nombre de cellules présenté correspond aux macrophages et non à la population totale de l'alvéole et que chez l'animal hétéroxénique dont l'état bactériologique est contrôlé de manière régulière * cette population de macrophages représente plus de 90 % de la population totale. L'influence des poussières par contre, ne peut pas être

* Contrôle bactériologique effectué par les soins du Dr. GUENET responsable de l'animalerie du Département de Protection.

éliminée et nos résultats ne nous permettent pas à l'heure actuelle de déterminer si les modifications observées répondent à un grand cycle biologique ou s'il s'agit simplement d'une réponse à une modification de l'environnement.

IV.4. - Evaluation de la population alvéolaire totale chez le rat

MACKLIN (1947) [131] a montré le premier qu'il était possible d'obtenir les macrophages du poumon soit par lavage endobronchique soit par extraction directe de fragments pulmonaires par une solution physiologique. Ces deux méthodes furent employées par la suite par différents auteurs et les premiers essais de quantification cellulaire furent effectués par LABELLE et BRIEGER (1959) [110]. BRAIN (1968) [24] a analysé les facteurs affectant le rendement du rinçage pulmonaire dont MYRWIK (1961) [153] avait codifié la technique, tandis que BENNETT (1966) [13] obtient des rendements très différents chez la souris en utilisant la technique d'extraction sur fragments, dont GERSING et SCHUMACHER (1955) [74] avaient montré l'intérêt.

Quelle que soit la reproductibilité de la méthode de lavage utilisée dans une série homogène, l'intercomparaison des résultats entre des séries d'animaux dont les caractéristiques sont variables ne permet que de constater les variations de la population extraite. La nature de ces variations ne peut être précisée car la fraction de macrophages extraits est inconnue. L'importance de ce phénomène peut être primordiale dans les cas pathologiques où le pourcentage de cellules extraites peut varier dans des proportions tout à fait aléatoires : des obstructions bronchiques, l'afflux de cellules inflammatoires dans l'alvéole, peuvent se comporter comme des paramètres importants. A la limite la légitimité par exemple de la comparaison des populations alvéolaires dans l'état conventionnel et l'état S.P.F. peut être mise en doute en partant de ce principe, si on ne raisonne que sur la population extraite par lavage.

Pour répondre à cette critique, nous avons cherché à introduire dans la population un étalon interne qui permette d'apprécier l'efficacité du rendement de lavage et nous autorise à en tirer des conclusions sur l'appréciation de la population alvéolaire totale.

Cette expérience est conduite sur rats O.F.E. de 250 g $\pm$ 30 g. Les rats sont soumis à un empoussiérage à l'hématite activée. Les courbes d'épuration

alvéolaires sont obtenues. Au moment du sacrifice des animaux on mesure :

- . le nombre de macrophages,
- . le pourcentage de cellules présentant au moins 3 grains d'hématite
- . l'efficacité du lavage exprimée par le rapport de la radioactivité du liquide de rinçage sur la somme de l'activité du poumon rincé et de l'activité du liquide de lavage
- . la population totale théorique obtenue en divisant le nombre total de macrophages extraits par le coefficient d'efficacité.

Enfin des contrôles histologiques courants sont effectués pour apprécier la position des particules d'hématite non extraites par le liquide de lavage.

IV.4.2. - Résultats

Les résultats de l'analyse cinétique de l'épuration de l'oxyde de fer ont fait l'objet de publications particulières: LEFEVRE (1969) [122] , LE BOUFFANT (1970) [119] , NENOT (1970) [156] . Nous en résumerons donc rapidement les données dans la figure 40 et le tableau 6 suivant.

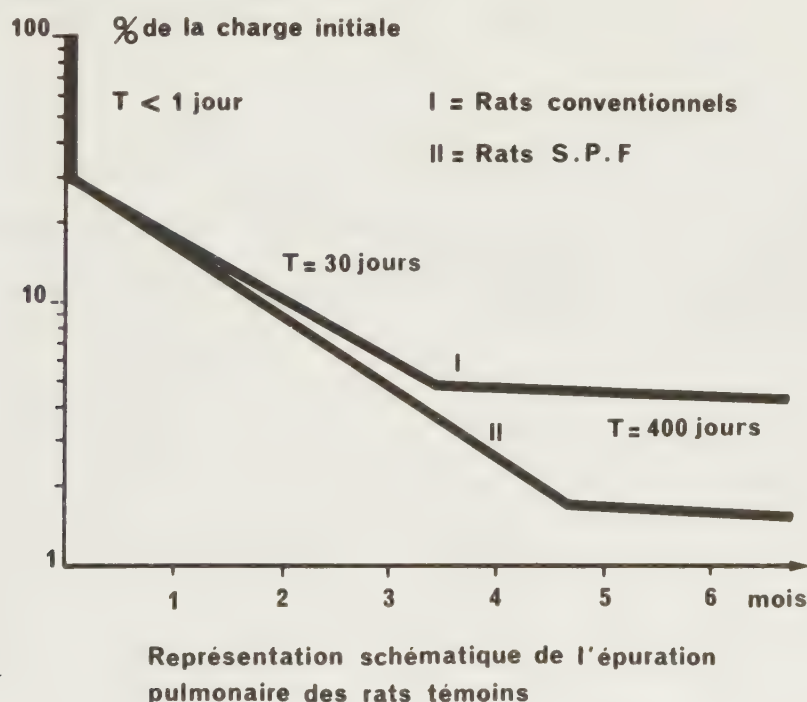


FIGURE N° 40

TABLEAU 6

REPARTITION DE L'HEMATITE DANS LES COMPARTIMENTS PULMONAIRES DU RAT O.F.E.,
MOYENNE DE 127 ANIMAUX

	ComPartiment N: 1	Compartiment N: 2
Période	0.41 σ 0.15	27.4 σ 7.7
Pourcentage	75.8 σ 6.7	24.4 σ 6.3

Le tableau 6 montre l'analyse par compartiments de l'épuration pulmonaire de l'hématite activée chez le rat. Cette analyse porte sur 127 rats et ne montre pas de différence significative entre les animaux mâles et femelles ou suivant la saison. LAFUMA 1971 [113]

Il apparait après inhalation de la poussière une phase rapide d'épuration des voies hautes suivies par une phase plus lente caractérisée par une exponentielle simple de période égale à $27,45 \pm 7,7$. Cette épuration intéresse la majeure partie de la rétention alvéolaire chez le rat S.P.F.

L'évolution dans le temps du rendement du rinçage alvéolaire est présenté dans la figure n° 41. On constate après une chute rapide de l'efficacité du rinçage que les mesures se répartissent après une semaine autour d'une valeur moyenne voisine de 40 %.

Les mesures du nombre de macrophages extraites et les caractéristiques de la population alvéolaire apparaissent dans le tableau VII où les valeurs représentent la moyenne des mesures effectuées sur un lot de 12 rats mâles tués le 15 et le 16ème jour après l'inhalation du Fer et 6 rats femelles tués dans les mêmes conditions.

Contrôle histologique :

Les poussières présentes dans le poumon 15 à 16 jours après l'empoussiérage sont pour la plupart intracellulaires. Le territoire de rétention est constitué par les macrophages intraalvéolaires seuls. Après lavage on constate que de nombreuses cellules apparaissent fixées à la paroi ou engagées dans les pores intraalvéolaires (Figures 42 et 43).

Discussion

Les mesures effectuées conduisent à la définition d'une population de macrophages nettement plus importante que celle obtenue par la technique directe de rinçage alvéolaire. Nous devons en examiner la signification.

L'analyse par la théorie des compartiments de la courbe décrivant l'épuration pulmonaire des rats montre (fig.n° 40) que l'épuration du poumon profond dépend essentiellement de la fuite d'un compartiment intermédiaire caractérisé par une exponentielle d'une période voisine de 1 mois.

On doit donc conclure que l'épuration totale des rats correspond soit à l'épuration d'un unique compartiment soit à l'épuration d'une cascade de compartiments non en équilibre, dirigée par la période du compartiment dont l'épuration est la plus lente.

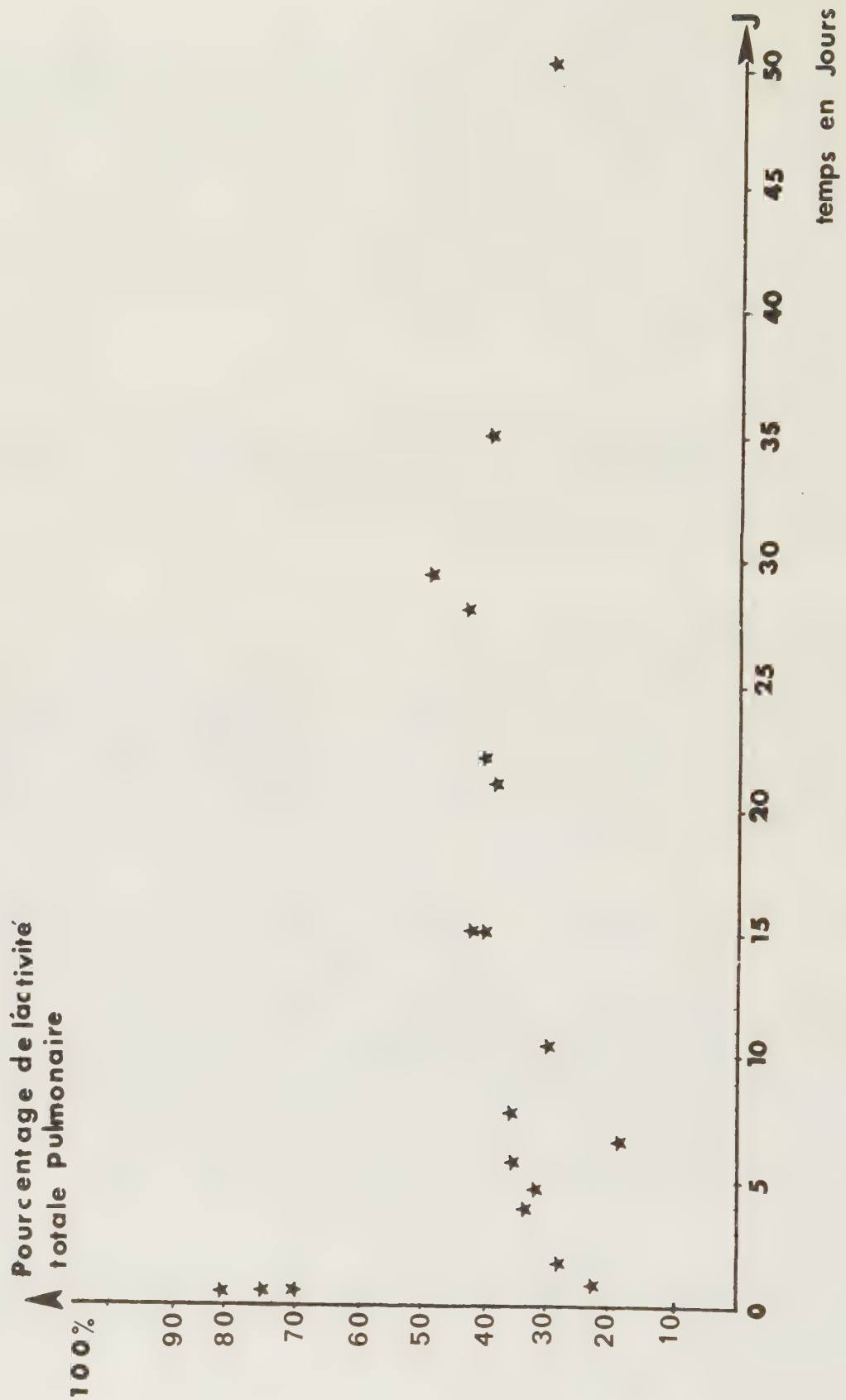


Fig. 41 - Evolution de l'activité totale en ^{59}Fe du liquide de rinçage pulmonaire en fonction du temps.

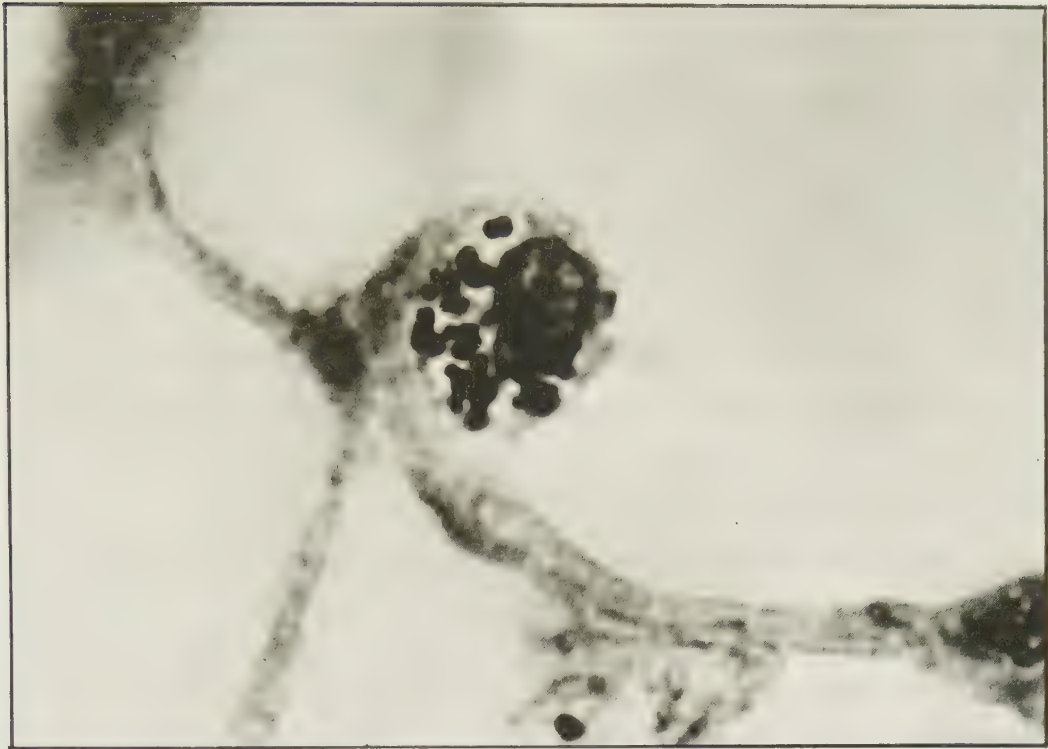


Fig.42 - Macrophage alvéolaire dans le poumon lavé. Noter l'adhérence sur la paroi

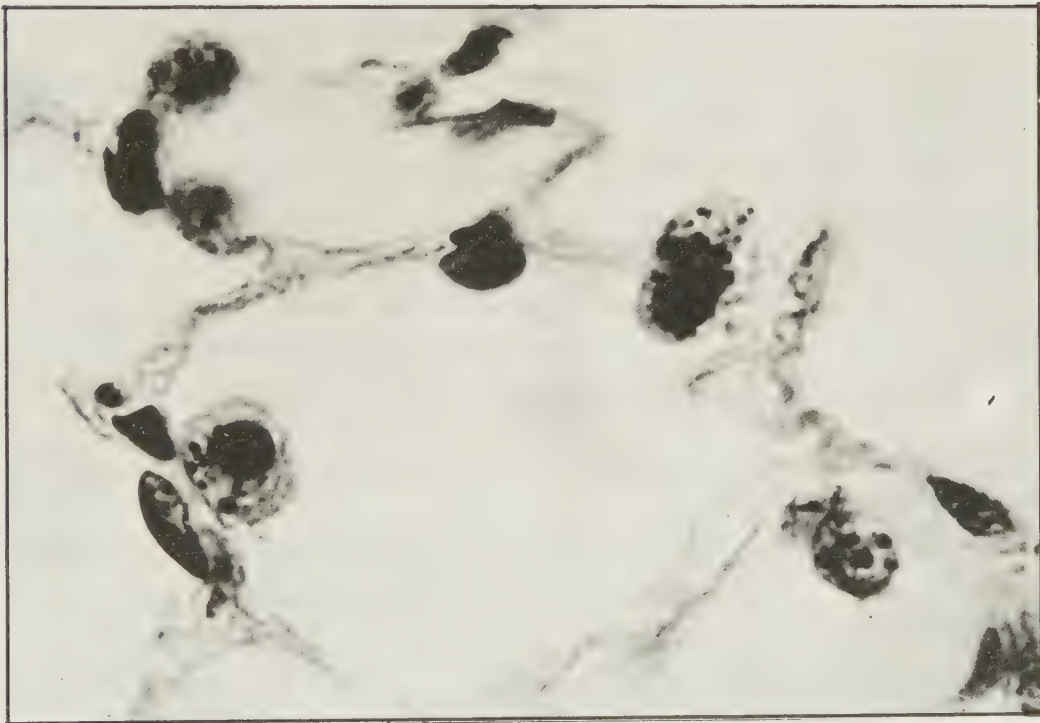


Fig.43 - Poumon lavé - Macrophage engagé dans un pore inter-alvéolaire

L'analyse histologique et cytologique permet de confirmer ce point de vue : le pourcentage de cellules ayant fixé l'hématite est très élevé et ne subit pas de variation notable pendant la période où nous avons fait nos mesures. Notamment il n'y a pas de participation des pneumocytes I : HAPKE, PEDERSON (1968) [88], SANDERS (1970) [185]. Il n'existe pas de territoire quantitativement appréciable de rétention des poussières en dehors du macrophage alvéolaire. La fraction d'hématite extraite par rinçage pulmonaire demeure constante et élevée du 10^{ème} au 50^{ème} jour au moins. Ces observations permettent de conclure que la population théorique de macrophages que nous déterminions représente une mesure satisfaisante du Pool total de cellules impliquées dans l'élimination de la poussière.

L'identification de ce pool avec celui des macrophages totaux peut susciter quelques réserves. Les macrophages qui demeurent dans le poumon après rinçage apparaissent souvent fixés sur la paroi et il se peut que ces cellules soient différentes des cellules extraites. Cette interprétation ne rejoint pas cependant celle de BRAIN (1970) [23] pour lequel l'extraction progressive des macrophages traduit simplement les différences d'intensité de l'adhérence à la paroi. Dans notre expérimentation l'étude successive des différents échantillons du rinçage alvéolaire ne nous a pas permis de constater une différence significative dans le pourcentage des cellules à hématite entre le premier et le dernier rinçage. Ce résultat est tout à fait en accord avec ceux de SANDERS (1969) [184]. Cet auteur étudiant la répartition cellulaire de l'oxyde de plutonium inhalé conclut que non seulement il n'y a pas de variation de l'indice de phagocytose au cours de 19 rinçages successifs, mais encore qu'il n'y a pas de variation du nombre de particules extraites dans ces rinçages. En conclusion, nous retiendrons donc qu'après une agression faible par la poussière d'oxyde de fer, les mesures que nous effectuons pendant la phase d'épuration de période égale à 27,4 j. et 7,7 j. nous permettent de définir une population totale théorique de tous les macrophages intraalvéolaires du poumon (Tableau 7).

IV.5. - Excrétion des macrophages alvéolaires par remontée trachéale chez le rat.

Les macrophages posés sur la paroi alvéolaire sont plus ou moins mobilisables (BRAIN et al.) (1970) [23], GUARNERI et LAURENZI (1968) [84], KILBURN (1969) [104]. Un certain nombre de ces cellules quittent le poumon par remontée ciliaire le long des bronches et de la trachée : DRINKER et SHAW (1920) [58]. Ce phénomène constitue un mécanisme physiologique d'élimination des particules étrangères qui ont atteint l'alvéole, MACKLIN (1951) [132]. L'étude quantitative de la vitesse de remontée des particules après phagocytose dans l'alvéole du rat a été entreprise pour la première fois par LA BELLE et BRIEGER (1959) [110].

TABLEAU 7

	N.macro. extraits $\times 10^6$	% hématite extraite	population total théorique	pourcentage de macro. hematite	
Rat ♂ Hiver	7.65	40.8	20.9	88.5	$\bar{X}$
	1 6	9.2	6.5	6 7	σ
Rat ♀ Et�	13.76	39.3	38.3	93.75	$\bar{X}$
	4.97	12.28	14.4	2.36	σ

puis codifiée comme méthode d'exploration de la fonction antixénique du poumon par LEFEVRE et al. (1968) [121], il revient à SPRITZER et WATSON (1964) [201] d'avoir mis au point une méthode directe d'analyse de la remontée trachéale des cellules alvéolaires. Le but du travail que nous présentons est de montrer que l'analyse de la courbe d'épuration de particules radioactives d'hématite permet de déterminer l'excrétion cellulaire par remontée trachéale.

IV.5.1. - Matériel et Méthodes

Les animaux utilisés sont des rats mâles OFE pesant 250 grammes environ au moment de l'expérimentation. Ils sont soumis à un empoussiérage à l'hématite activée selon le protocole précédemment décrit, SEDAGHAT et coll. (1971) [189 bis]:

- . 12 rats témoins sont empoussiérés au ^{59}Fe sans subir d'autres interventions

- . 6 rats sont soumis au sondage gastroesophagien selon SPRITZER et WATSON (1964) [201] quinze jours après l'inhalation du ^{59}Fe .

- . 6 rats non empoussiérés subissent cette intervention après trachéotomie. Les animaux sont maintenus en survie 3 jours pour les trachéotomisés, 5 jours pour les animaux empoussiérés par injection de solutions isotoniques de glucose et de chlorure de sodium.

IV.5.1.1. - Sondage gastroesophagien

Les liquides déglutis sont recueillis dans le flacon fixé sur le flanc de l'animal. Les cellules sont dénombrées directement à l'hématimètre. En outre, à des intervalles de temps connus, les flacons des animaux empoussiérés sont remplis d'alcool éthylique. Des prélèvements aliquotes sont effectués et les cellules sont séparées par filtration sur millipore de porosité $0,8\ \mu\text{m}$. Les filtres sont colorés au Noir Amide et différenciés dans l'alcool ammoniacal. On détermine le nombre total de cellules chargées d'hématite présentes sur le filtre. On évalue le nombre total de macrophages après avoir calculé au moment de la mort de l'animal, le pourcentage des macrophages du poumon présentant de l'hématite. SEDAGHAT et coll. (1971) [189 bis].

La mesure de l'activité γ du ^{59}Fe est effectuée sur les prélèvements des liquides de déglutition. Cette mesure est rapportée à celle des macrophages exprimée en pourcentage de l'activité totale. On obtient ainsi une nouvelle mesure du nombre de macrophages excrétés.

TABLEAU 8

EXCRETION DES CELLULES PAR REMONTEE BRONCHIQUE

Conditions expérimentales	$N / 10^6$	$N_1 / 10^6$	$N_2 / 10^6$	$N_3 / 10^6$
6 Rats mâles empoussiérés sondage gastroœsophagien	17.3 σ 6.3	0.51 σ 0.26	0.62 σ 0.19	
12 Rats mâles empoussiérés				0.70 σ 0.17
6 Rat mâles Tracheotomisés sondage gastroœsophagien	9.41 σ 5.3			

Comparaison des différentes méthodes de mesure
Valeurs moyennes exprimées en nombre de cellules excrétées par 24 heures

IV.5.1.2. - Exploitation des courbes de décroissance

Enfin l'exploitation des courbes de décroissance de l'activité corporelle totale fournit une base de calcul pour une dernière mesure du nombre des cellules excrétées au moment de la mort, le comptage externe des rats représente une valeur A_0 considérée comme égale à 100 % : on détermine par calcul, à partir de la courbe de décroissance, BAZIN, MARCHADIER, LAFUMA (1968) [117], SEDAGHAT et coll. (1971), la valeur théorique A , 24 heures après la mesure A_0 . La mesure de l'activité des macrophages extraits à la mort de l'animal permet de calculer le nombre de macrophages qui devront quitter le poumon pour assurer la décroissance $A_0 - A$.

En résumé, nous disposons donc de 4 types de mesures :

- N = Nombre de cellules de type macrophage mesuré à l'hématimètre
- N_1 = Nombre de macrophages calculé par comptage de cellules identifiées sur filtre
- N_2 = Nombre de macrophages théorique calculé d'après l'excrétion du fer dans le flacon de prélèvement
- N_3 = Nombre de macrophages théorique calculé d'après les courbes d'épuration.

A ces mesures directes ou indirectes de l'excrétion nous nous sommes efforcés de donner une base de comparaison en introduisant un témoin intraalvéolaire de la population restante : 10 animaux ont reçu par voie intratrachéale 100 μCi de thymidine tritiée. On sait que dans ces conditions, MASSE et coll. (1970) [138-17], on marque un certain nombre de cellules à l'intérieur de l'alvéole. L'évolution des cellules marquées est suivie pendant 10 jours.

IV.5.2.- Résultats

Les résultats apparaissent dans les deux figures suivantes: Tableau 8, Fig. 44

IV.5.3.- Discussion

Les mesures des cellules excrétées peuvent se classer en deux catégories : celles mesurées directement à l'hématimètre, dont les valeurs sont égales ou supérieures à 10^7 , et celles, indirectes, calculées après incorporation d'un marqueur cytoplasmique, qui sont voisines de 10^6 . SPRITZER et coll. (1968) [202] concluent que pour une grande part au moins les cellules dégluties sont d'origine pulmonaire. Les mesures que nous avons effectuées après trachéotomie ne sont pas en faveur de cette hypothèse. Malgré l'interruption du transit

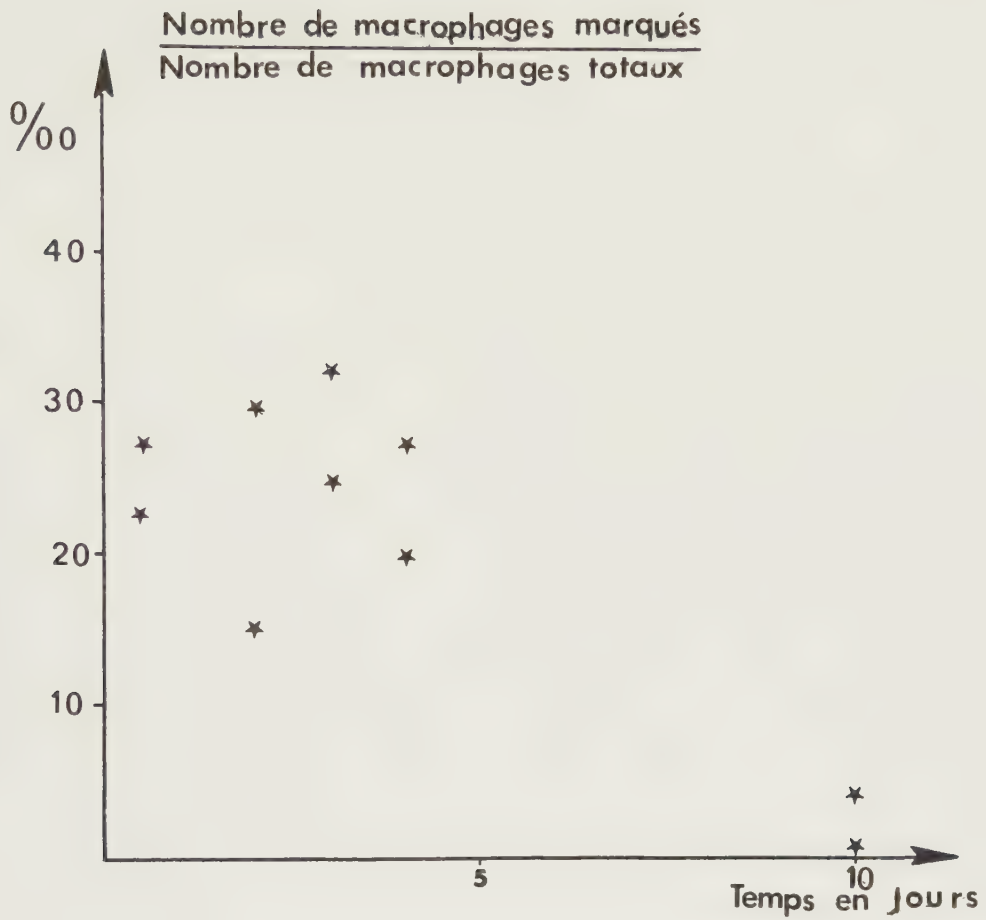


Fig. 44 Evolution de la répartition des macrophages marqués dans l'alvéole après injection intratrachéale de thymidine tritiée.

trachéal, les cellules excrétées continuent à être très nombreuses. Elles sont moins nombreuses cependant que dans le cas du sondage gastro-oesophagien seul en raison de la gêne à la déglutition provoquée par la trachéotomie. Il apparaît ainsi que les mesures directes sont entachées d'une erreur par excès, due à la présence de cellules du carrefour aérodigestif. Il en va autrement pour les mesures indirectes déterminées, soit par numération des cellules marquées à l'hématite, soit par comptage γ des animaux, des liquides de lavage pulmonaire et des liquides de déglutition recueillis par la technique de SPITZER. Il existe une corrélation satisfaisante entre le nombre N_1 de cellules déterminé par comptage sur filtre et le nombre N_2 de cellules déterminé par le comptage γ des liquides de déglutition. Ces valeurs indiquent que l'excrétion des particules est essentiellement assurée par le transport macrophagique. Il apparaît également que l'excrétion de l'hématite ne diffère pas sensiblement, que les animaux soient traités ou non par sondage gastrooesophagien. Ce résultat est en accord avec ceux de WATSON et al. (1969) [217].

La méthode de traçage par particules phagocytées, cependant, n'est pas exempte de critiques : les cellules peuvent mourir et échanger leurs particules, HEPPLESTON (1963) [90], et la cellule après phagocytose peut avoir un comportement modifié. Ce dernier point pourrait expliquer les chiffres très différents obtenus par SPRITZER et al. (1968) [202] et ceux relevant des mesures N_1 , N_2 , N_3 . Cependant, si nous considérons que les mesures directes représentent une meilleure approche de l'excrétion quotidienne des macrophages pulmonaires, nous devons admettre que ni le monocyte du sang VAN FURTH (1970) [210], ni la multiplication locale de cellules dans le poumon ne peuvent compenser une telle déplétion cellulaire ; seuls les macrophages tissulaires, dont NICOL et CORDINGLEY (1967) [158] pensent que le mécanisme physiologique d'excrétion est l'élimination par voie trachéobronchique, pourraient assurer ce rôle. Cette hypothèse n'est toutefois pas vérifiée par les expériences de ADLERSBERG et coll. (1969) [3] qui montrent que l'épuration bronchique des particules de latex fixées dans les macrophages du foie et de la rate est un phénomène particulièrement lent : environ 1 % par semaine. En outre si nous tenons compte de l'évaluation de la population alvéolaire totale, SEDAGHAT et al. (1971), la période de renouvellement des macrophages alvéolaires non chargés de poussières serait inférieure à 24 heures. L'examen de la fig. n° 44 permet d'éliminer cette hypothèse. En effet le nombre de cellules marquées par la thymidine ne diminue pas pendant les 4 premiers jours dans les proportions que nécessiterait un renouvellement de la population alvéolaire aussi rapide. Il n'est pas possible de poursuivre les mesures au-delà de quelques jours car les cellules subissent une irradiation létale en raison de la dose de tritium utilisée pour inhiber la division cellulaire et conserver constante la population ainsi marquée.

Enfin si la phagocytose des particules de fer modifiait sensiblement l'épuration des cellules avec la quantité de fer que nous avons utilisée on pourrait s'attendre à un enrichissement progressif du poumon en cellules très chargées de particules et à une vitesse d'épuration globale dépendant de la quantité de fer inhalé. Ces observations n'ont jamais été faites pour des quantités inférieures à 100 µg dans le poumon du rat.

En conséquence, nous admettons que l'élimination des macrophages totaux du poumon coïncide avec celles des macrophages chargés d'hématite et représente $0,7 \times 10^6$ cellules excrétées par 24 heures dans le lot d'animaux que nous avons étudié.

IV.6. - Renouvellement des macrophages alvéolaires

IV.6.1. - Synthèse d'ADN par les macrophages alvéolaires

De nombreux auteurs dont GUIEYSSE, PELISSIER (1920) [85] MACKLIN (1954) [133] HEPPLESTON et COLLET ont observé des images de mitose ou de "division amitotique" dans l'alvéole pulmonaire. A l'aide de la colchicine BERTALANFFY (1968) [16] SIMNETT et HEPPLESTON (1966) [193], PINKETT, COWDREY, NOWELL (1966) [162] ont montré que des cellules morphologiquement semblables aux macrophages pouvaient être bloquées en métaphase à l'intérieur de l'alvéole. SPENCER et SHORTER (1962) [200] SHORTER, TITUS et DIVERTIE (1964) [192], EDWARDS et KLEIN (1961) [61], STRECKER (1965) [203] ont montré sur coupes histologiques que ces mêmes cellules incorporent la thymidine tritiée dont CRONKITE et coll. (1960) [53] avait souligné l'intérêt en recherche biologique. BENNETT (1966) [13] in vitro insiste sur la différence de comportement des macrophages d'origine alvéolaire par rapport aux macrophages péritonéaux. Les premiers se montrent capables de se diviser fréquemment alors que les seconds ne le font qu'extrêmement rarement.

VAN FURTH (1970) [210] pour sa part insiste sur le faible pourcentage de macrophages alvéolaires marqués après injection intraveineuse de thymidine tritiée, alors que les précurseurs médullaires, dont VIROLAINEN (1968) [212] a montré qu'ils pouvaient être maintenus en colonie in vitro, le sont à un degré beaucoup plus important.

Ainsi, avec des nuances sur l'appréciation de l'importance du phénomène il ne saurait être nié que les macrophages alvéolaires ont un métabolisme actif de l'ADN nucléaire et notamment plus actif que les macrophages péritonéaux, BENNETT (1966) [13], VAN FURTH (1968) [209], MASSE et coll. (1970) [138-17].

L'étude de ce phénomène par les méthodes classiques : isolement et culture in vitro, ou injection de précurseur marqué par voie intraveineuse, est susceptible de critiques, MASSE et coll. (1970) [138-1]:

1° L'isolement des cellules par adhérence à la lamelle opère une sélection dans la population : VOISIN et coll. (1963) [213], et l'étalement peut modifier le comportement cellulaire.

2° Les rapports du macrophage et du milieu intérieur du poumon sont particulièrement discrets : KARRER (1958) [102]. Seuls quelques replis de la surface cellulaire semblent au contact du pneumocyte I et un volume sans doute très faible de la cellule est baigné par le fluide alvéolaire, FREY-WISSLING (1953) [70]. Dans ces conditions, l'incorporation d'un précurseur marqué, dont la cinétique d'épuration plasmatique est rapide, comme c'est le cas pour la thymidine, peut être extrêmement réduite.

Dans ce travail nous avons comparé avec la technique d'incubation du poumon in vitro le pourcentage de cellules marquées après incorporation de thymidine tritiée dans différents lots de rats.

Résultats : Tableau n° 9

Discussion - conclusion

Mis à part le lot de rats germ-free, le pourcentage de cellules en phase de synthèse paraît d'une remarquable constance. Même dans le cas de la phagocytose de l'oxyde de fer où plus de 90 % des cellules de l'alvéole ont fixé plus de deux grains d'hématite, le pourcentage de cellules comptant au moins dix grains d'argent au-dessus du noyau, après autoradiographie, ne diminue pas de manière très sensible. Ceci implique que des cellules poursuivent leur synthèse d'ADN après granulopexie importante des particules intraalvéolaires : c'est effectivement ce qui est observé : Fig. N° 45.

Toutefois les cellules en synthèse se remarquent essentiellement parmi celles dont la fixation est très discrète, et en général bien que les exceptions soient courantes parmi les cellules dont la basophilie cytoplasmique est notable et dont le volume cytoplasmique est réduit. Rarement, on observe des cellules vacuolaires marquées, plus rarement encore des cellules binucléées. Ainsi à la grande variabilité de la population alvéolaire, notamment en ce qui concerne l'influence de la saison, s'oppose la constance du pourcentage de cellules en phase de synthèse. Ceci indique que le nombre total de cellules incorporant la thymidine augmente dans les mêmes proportions que la population totale.

TABLEAU 9

	Nombre d'animaux analysés	% de macrophages marqués
Rats ♂ OFE Hiver	25	4.4 σ 0.5
Rats ♂ OFE été	25	4.6 σ 0.6
Rats ♂ hématite OFE Hiver	18	4.3 σ 1.1
Rats ♀ hématite OFE été	6	4.6 σ 1.7
Rats Axéniques	7	3.4 σ 0.3

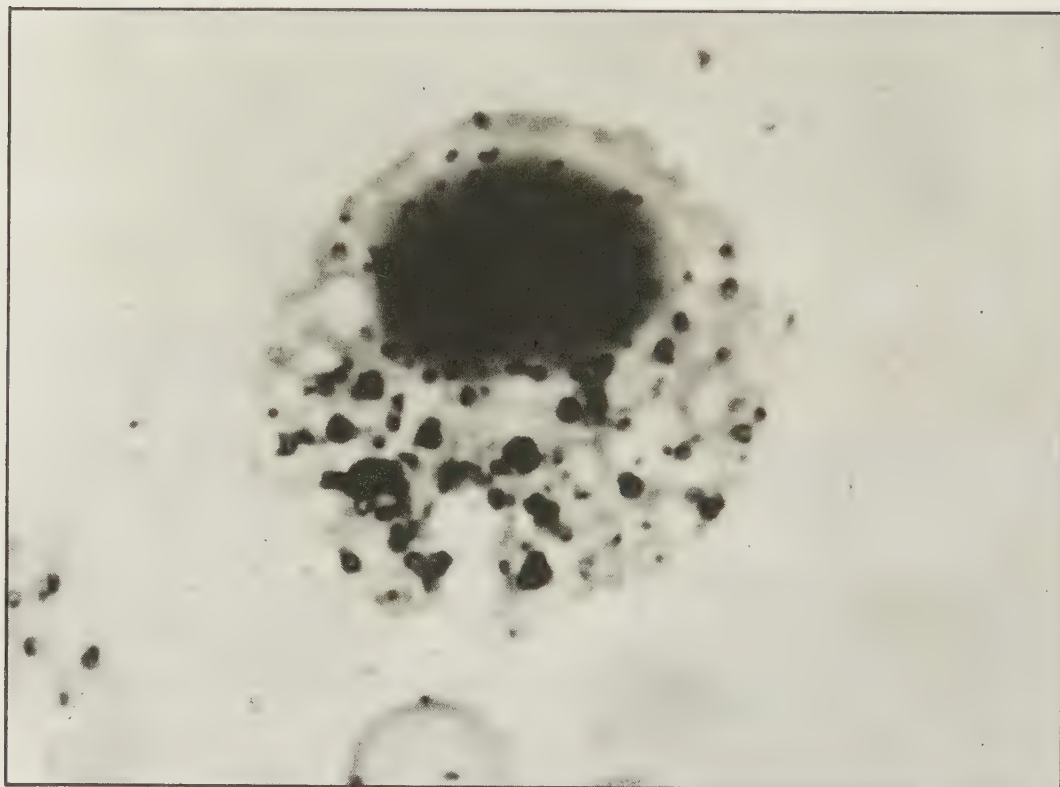


Fig.45 -

Macrophage alvéolaire, autoradiographie. La cellule conserve son aptitude à synthétiser l'ADN malgré une granulopexie importante de particules d'hématite

Pour reprendre nos résultats précédents (Tableau 10) SEDAGHAT et coll.(1971), MASSE et coll.(1971) [138-27] on constate que dans le cas des rats empoussiérés à l'hématite, le nombre de cellules en phase de synthèse double en même temps que la population. En outre, le nombre de cellules en phase de synthèse apparaît toujours supérieur à celui des cellules excrétées par remonte bronchique : tableau 8.

IV.6.2. - Durée de la phase "S"

Mesure de la phase de synthèse.

Quel qu'en soit l'intérêt pour l'appréciation de l'état d'équilibre de la population, l'indice de marquage après un contact court avec la thymidine tritiée ne permet pas de caractériser le temps d'évolution des différentes cellules. En effet, dans le cas d'une population de cellules intermitotiques à mitose homoplastique, l'indice de marquage est égal au rapport de la durée de la phase de synthèse à la durée totale du cycle cellulaire. Comme l'un et l'autre paramètre évoluent dans le même sens selon les cellules concernées, l'indice de marquage peut ne pas traduire des variations importantes des durées absolues du cycle de renouvellement cellulaire.

Dans le cas d'une population plus complexe où apparaissent des cellules postmitotiques réversibles ou non, où la différenciation cellulaire se traduit par des mitoses hétéroplastiques, l'indice de marquage ne reflète plus aucun élément du cycle cellulaire qu'il devient alors nécessaire de caractériser par une autre méthode.

Nous avons utilisé à cette fin les méthodes du blocage à la colchicine, de l'étude quantitative de l'incorporation de thymidine tritiée et celle du double marquage de HILSCHER et MAURER (1962) [937].

Méthode à la colchicine

Les résultats sont extrêmement variables. Dans un lot homogène de 10 rats OFE mâles, le nombre de cellules bloquées en métaphase trois heures après l'injection de colchicine a varié de 0,1 % à 0,4 %, Fig. n° 46, ce qui correspond à un temps de doublement compris entre 10 et 40 jours.

La mauvaise qualité de ces résultats correspond vraisemblablement à un mauvais contrôle des conditions expérimentales. Nous avons déjà discuté le rôle de la nature des relations macrophage-milieu intérieur, à propos de l'utilisation de la thymidine, il est évident que les mêmes critiques s'appliquent à l'utilisation de la colchicine, avec une condition aggravante liée à la toxicité de la colchicine en milieu pulmonaire. MACKLIN (1954) [1337] qui n'incite pas à utiliser la voie intratrachéale.

TABLEAU 10

	Population totale théorique	N. total de cellules en phase de synthèse
Rats ♂ Hiver	20.9×10^6	919.600
Rats ♀ été	39.3×10^6	1.780.000

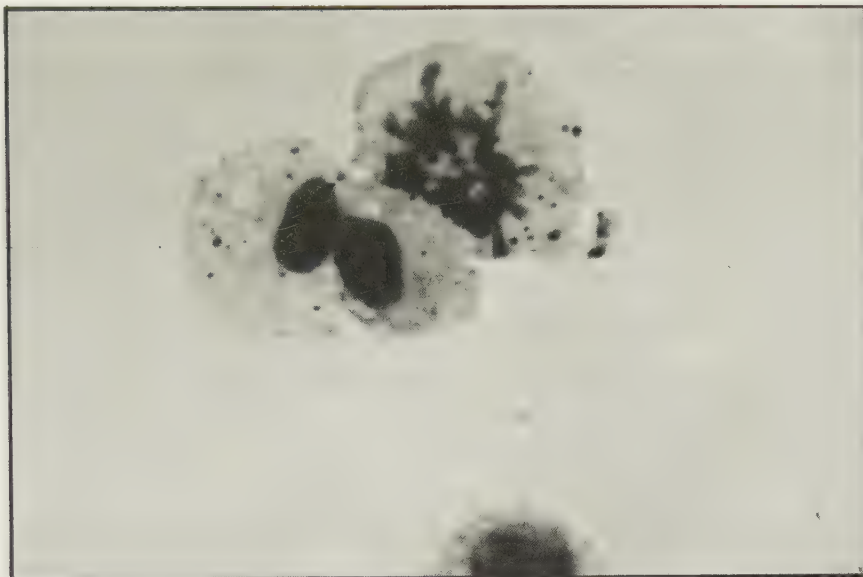


Fig. n° 46

Mitose de macrophage alvéolaire après blocage par la colchicine

Néanmoins, ces résultats permettent d'apprécier l'importance de la production locale de cellules. Si on admet les valeurs inférieures voisines de 10 jours, ce qui paraît justifié puis que les erreurs commises donnent des résultats par défaut, on constate que le renouvellement local dépasse la perte par excrétion bronchique. Ceci peut être expliqué par le fait que des cellules meurent dans l'espace alvéolaire. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode qui permette de connaître quantitativement l'importance de ce phénomène.

Etude quantitative de l'incorporation de thymidine.

Cette méthode a pour but de caractériser la vitesse d'incorporation de la thymidine dans les noyaux de macrophages alvéolaires et de comparer cette vitesse à celle d'une population cellulaire connue, en l'occurrence des lymphocytes placés dans les mêmes conditions de survie. Certains auteurs dont HILSCHER et MAURER (1962) [93] ont montré que la vitesse d'incorporation était inversement proportionnelle à la durée de la phase de synthèse.

Dans notre expérimentation, la vitesse d'incorporation s'est révélée extrêmement variable et ne nous a permis aucun développement quantitatif. Nous avons opéré avec des solutions d'activité spécifique variable et vérifié de cette manière que ces résultats ne dépendaient pas d'une répartition variable du pool de thymidine dans les populations utilisées.

Il faut donc voir dans ce phénomène la traduction de conditions expérimentales insuffisamment maîtrisées, ce qui s'explique par la complexité du tissu alvéolaire et le mode de survie du tissu.

Toutefois, il a toujours été remarqué aussi bien par comptage en scintillation des β du tritium que par autoradiographie, que l'activité incorporée dans les noyaux de macrophages était voisine de l'activité incorporée dans les noyaux de lymphoblastes dans les mêmes conditions expérimentales.

Double marquage :

Les animaux mâles de 250 g reçoivent la thymidine tritiée par voie intratrachéale et la thymidine ^{14}C lors de l'incubation in vitro du poumon. Après autoradiographie on détermine le nombre de cellules marquées uniquement par ^3H et le nombre de cellules marquées par ^3H et ^{14}C .

Soit t le temps compris entre les deux incorporations, la durée théorique "S" de la phase de synthèse est déterminée par :

$$S = \frac{\text{Nombre de cellules marquées en } ^3\text{H} + \text{Nombre de cellules marquées } ^3\text{H et } ^{14}\text{C}}{\text{Nombre de cellules marquées } ^3\text{H}} \times t$$

Dans ces conditions un lot de 6 rats après lecture d'au moins 200 cellules marquées $S = 7,8$ heures Ecart type 1,3

Discussion-conclusion

Seule la technique du double marquage nous permet d'apprécier avec une reproductibilité satisfaisante l'une des périodes du cycle cellulaire.

Nous devons remarquer que la technique utilisée introduit un facteur d'erreur lié à la distribution du marqueur par injection intratrachéale. Rien ne permet d'affirmer que la thymidine tritiée gagne tous les segments du poulmon. Pour tenir compte de ce facteur nous avons basé notre calcul sur les seules cellules marquées par le tritium. En effet nous estimons que lors du marquage in vitro au ^{14}C la diffusion du marqueur est totale et doit dans tous les cas atteindre les cellules qui ont incorporé le ^3H pendant la première phase de l'expérience.

Compte-tenu de ce que l'on sait de la durée de la phase G2 et de la mitose dans les différents types cellulaires connus, cette appréciation de la durée de la phase de synthèse permet d'affirmer que plus de 10^6 cellules nouvelles apparaîtront dans l'alvéole au bout de 24 heures à condition que toutes les cellules doublant leur ADN nucléaire passent en mitose et donnent deux cellules filles. Ceci confirme les résultats observés après blocage en métaphase par la colchicine, à savoir que la production cellulaire locale est potentiellement supérieure à l'excrétion. En dehors de la mort cellulaire, il est possible que la formation de cellules bi- ou même multinucléées corrige cet excès. Dans ce cas, la cellule mère ne donne plus des cellules filles mais une cellule binucléée. L'existence de cellules binucléées dont un seul noyau synthétise l'ADN permet d'affirmer que ce mécanisme existe bien.

Si nous comparons nos résultats avec ceux de SHORTER, TITUS, DIVERTIE (1964) [192], SIMNETT, HEPPLESTON (1966) [193], nous constatons que notre mesure de S est compatible avec les observations antérieures. Il apparaît dans les résultats de ces auteurs qui travaillent sur coupes histologiques une catégorie de cellules caractérisées par une durée de la phase de synthèse S voisine de 8 heures et nous confirmons donc qu'il s'agit bien des macrophages alvéolaires.

Si nous comparons également ces résultats avec ceux de VAN FURTH (1970) [210], nous constatons que le taux maximum du nombre de cellules marquées, que cet auteur observe dans l'alvéole le 4ème jour après l'injection intraveineuse de thymidine, peut être dû à la division des cellules marquées de l'alvéole, dont VAN FURTH admet qu'elles représentent 2,5 % des cellules totales.

Ceci ne remet pas en cause l'origine monocytaire des macrophages, car il faut distinguer entre origine ontogénétique et origine parentale. Les cellules de l'alvéole qui se divisent peuvent avoir une origine commune avec le monocyte sanguin, voire même dériver du monocyte sanguin. Mais nous avons la preuve qu'il existe une très forte probabilité pour que les cellules intra-alvéolaires dérivent de cellules morphologiquement identiques à elles-mêmes.

La constance du pourcentage de macrophages en phase de synthèse est un phénomène assez troublant. Il indique que les cellules subissent une mitose hétéroplastique. Deux possibilités existent : soit une cellule mère se divise en deux cellules filles qui ont perdu la propriété de se diviser et dans ce cas la numération des cellules en phase de synthèse est un témoin de la migration des monocytes sanguins rapidement différenciés dans l'alvéole, soit la cellule mère donne une cellule identique à elle-même et une cellule fille qui a perdu l'aptitude à la mitose. A l'heure actuelle nos résultats ne nous permettent pas de trancher entre ces deux solutions. Toutefois l'existence de cellules à valeur de cellules souches de promonocytes démontrée par BELL et SHAND (1970) [12] peut indiquer que la deuxième hypothèse est plus probable.

IV.6.3. - Influence des macrophages tissulaires dans le peuplement de l'alvéole

DRINKER et SHAW (1920) [58] avec le dioxyde de manganèse puis IRWIN (1932) [101] avec l'oxyde de thorium, dont LAMBIN (1932) [114] avait montré l'intérêt pour la localisation du SRE du foie et de la rate, ont mis les premiers en évidence la migration de particules ou de cellules depuis des sites de déposition primitifs comme le foie jusque dans l'alvéole. Par la suite, NICOL et BILBEY (1958) [157] ont insisté sur l'importance dans ce phénomène des facteurs endocriniens, et notamment des oestrogènes, dont SPECTOR (1958) [198] avait montré le rôle sur le peuplement de l'utérus par les cellules inflammatoires au cours du cycle oestral. En étudiant les modalités d'élimination du carbone colloïdal dont HALPERN et coll. (1950) ont fait l'instrument de choix pour l'étude de la colloïdopexie, NICOL et CORDINGLEY (1967) [158] sont arrivés à la conclusion que l'excrétion trachéobronchique constituait un phénomène physiologique et qu'elle représentait le mode d'élimination naturel pour les macrophages des tissus. Les résultats observés par ces auteurs étaient néanmoins surtout quali-

tatifs, et cela devait entraîner ADLERSBERG et coll. (1969) [3] à tenter de calculer les coefficients de passage entre les différents compartiments, comme nous l'avons vu dans le chapitre traitant de l'excrétion trachéale des macrophages alvéolaires.

IV.6.3.1. - Méthode

Dans cette partie de notre travail nous avons utilisé l'hydroxyde de ^{144}Ce , une substance colloïdale dont la fixation est essentiellement hépatique à modalité d'élimination beaucoup plus rapide que le latex de ADLERSBERG [3] et coll. Comme NICOL et CORDINGLEY (1967) [158] nous avons extrait les cellules alvéolaires pendant 45 jours après la contamination et nous avons, à l'aide de la technique de SPRITZER, tenté de rechercher pour quelle part l'excrétion pulmonaire intervenait dans l'élimination globale de la terre rare.

24 rats ont été utilisés. Ils ont reçu $2\text{ }\mu\text{Ci}$ par voie intraveineuse. 6 animaux ont été cathétérisés du 21^{ème} au 28^{ème} jour après la contamination. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité totale injectée après comptage γ du pic photoélectrique, les cellules chargées de cérium sont recherchées par autoradiographie sur frottis.

IV.6.3.2. - Résultats

La répartition de la terre rare est identique à celle publiée par SKUPINSKI et coll. (1967) [194]. Tableau n° 11.

Avec des fluctuations importantes, le pourcentage d'activité totale extraite par lavage pulmonaire a atteint au maximum 2 % après avoir subi une croissance irrégulière depuis le premier jour après la contamination.

L'activité dans les liquides de déglutition est inférieure à $1/10.000^e$ de l'activité totale injectée, la plupart du temps non décelable : moins de 1 cellule/500 est observée marquée après autoradiographie. Ce sont en général des cellules de très forte activité spécifique.

IV.6.3.3. - Discussion - conclusions

Le cérium colloïdal fixé dans le SRH du foie et des autres tissus n'est pas éliminé par voie pulmonaire. Bien que l'élimination soit fécale, ce n'est pas par la voie décrite par IRWIN (1932) [101] pour le dioxyde de thorium que

TABLEAU 11

Répartition du cerium en fonction du temps (SKUPINSKI et coll 1967)

% de l'activité injectée

Temps	Poumons
1 heure	60 - 80
24 heures	50 - 80
1 semaine	20 - 40
1 mois	10 - 30
3 mois	10 - 20
6 mois	5 - 15
12 mois	5

% de l'activité migrée

Temps	Foie	Rate
1 heure	80.24	6.27
24 heures	68.44	8.32
1 semaine	21.32	8.43
3 mois	4.90	4.46
6 mois	3.94	4.57
12 mois	2.90	4.12

se produit cette élimination mais par la voie biliaire. Bien que les particules de latex de ADLERSBERG et coll. (1969) [3] soient par leur nature peu sujettes à une élimination par cette voie, ce mécanisme doit être suspecté lorsque l'on traite de l'élimination fécale. L'existence de migrations cellulaires ne peut être niée comme le signalent ADLERSBERG et coll.: de nombreuses cellules libres marquées peuvent être vues dans les espaces portes ou centrolobulaires du foie, cependant l'importance de ce phénomène, particulièrement dans la population de l'alvéole, paraît particulièrement faible. Ceci pose une nouvelle fois le problème de la "fiabilité" du marquage cytoplasmique ainsi que le remarque HEPPLESTON (1970) [91]. Les particules de carbone, NICOL et CORDINGLEY (1967) [158], le thorotrast, IRWIN (1932) [101], le dioxyde de manganèse, DRINKER et SHAW (1920) [58], le bleu d'outre-mer, RASCHE et ULMER (1965) [171], le polyvinyle-N-oxyde, GRUNSPAN et ANTWEILLER (1970) [83] (une substance dont FETZER (1967) [68-1] a montré qu'elle se concentrait dans les lysosomes du macrophage alvéolaire) se concentrent progressivement dans les macrophages alvéolaires. Cette propriété semble plus particulièrement liée à la nature des marqueurs qu'au cycle biologique des macrophages tissulaires. Il s'agit dans tous les cas de particules extrêmement fines dont GIESEKING (1958) a montré qu'elles peuvent passer directement au travers de l'épithélium. L'enrichissement intraalvéolaire peut n'être dû qu'au phénomène présenté dans la fig. n° 47 qui traduit le déplacement des particules vers un espace peu dépendant du milieu intérieur. A l'appui de cette thèse nous remarquerons que ADLERSBERG (1969) et coll. attribuent au poumon essentiellement un rôle de stockage dans les espaces septaux.

Il nous faut remarquer en outre que certaines particules très fines ne sont pas excrétées par voie bronchique ; c'est le cas de l'or colloïdal, ainsi que le remarque ROSER (1970) [178] et que les macrophages réinjectés par la voie générale ne se retrouvent qu'en faible quantité dans le poumon, RUSSEL et ROSER (1968) [179]

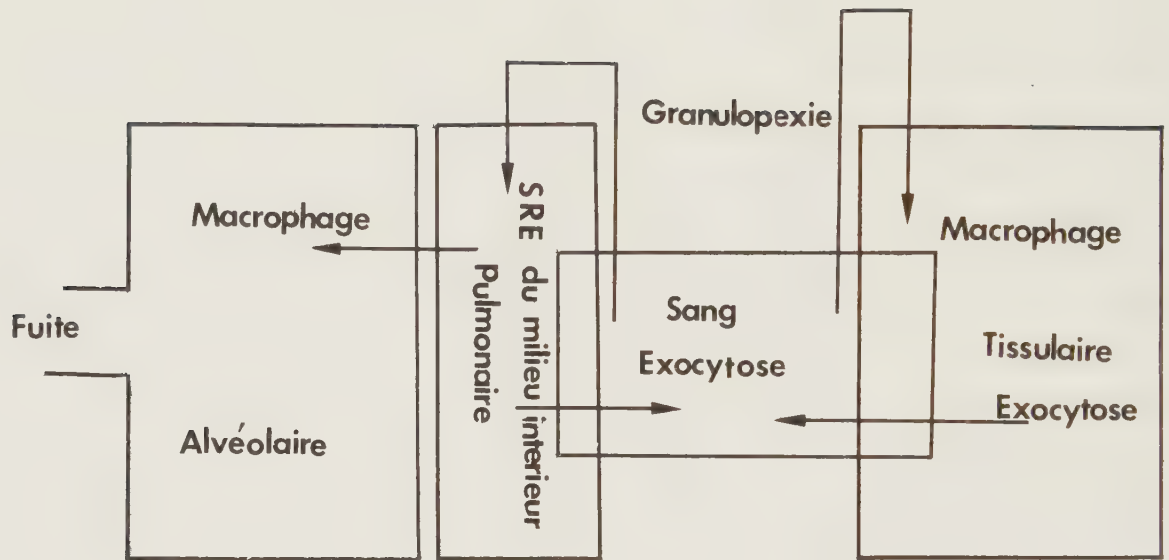


Fig. 47

IV.7 - Intoxication à la silice et au plutonium. Adaptation de la population alvéolaire à l'agression.

L'évaluation de la toxicité d'un gaz, d'un aérosol ou d'un empoussiérage pour le poumon, repose essentiellement sur des modifications tardives ventilatoires radiologiques ou histopathologiques. L'intérêt d'un test d'analyse cinétique de l'épuration pulmonaire réside dans le fait qu'il permet dans des délais raisonnables de s'assurer de l'intégrité de la fonction antixénique non spécifique. Les altérations de cette fonction entraînent la stase des toxiques non dégradés et favorisent le passage septal. Elles permettent aussi l'accumulation intraalvéolaire des agents nocifs de toute nature inhalés de manière continue. L'analyse que nous présentons ici a pour but de fournir les bases de physiopathologie cellulaire qui permettront de dégager les mécanismes conditionnant le ralentissement de l'épuration alvéolaire par remontée bronchique. Deux types de toxiques ont été étudiés : Le plutonium-239 et la silice qui provoquent aux doses convenables, NENOT et al.(1970) [156], LE BOUFFANT et al. (1970) [119], une altération comparable de la clearance alvéolaire mise en évidence par la technique précédemment décrite, LEFEVRE et al. (1968) [121].

L'expérience est conduite sur des animaux mâles et femelles OFE, à différentes périodes de l'année:

- . 48 rats mâles sont soumis aux aérosols de plutonium
- . 6 rats femelles ont inhalé de la silice
- . 24 rats témoins ont inhalé l'hématite seule

En outre, sur un lot de 12 rats, on a vérifié que l'aérosol produit par une solution nitrique 0,5 N ne modifiait ni les constantes de la population, ni l'épuration de l'hématite. En dehors des mesures décrites précédemment, on recherche sur coupes semi-fines, à évaluer le nombre de macrophages étalés après incubation du poumon dans le liquide de Mac-Coy. On constate à l'examen de ces coupes en effet, que certains macrophages s'étalent sur les parois, Fig.n° 18. Dans ce cas, on constate que l'aspect des cellules est modifié. Le hyaloplasme s'étend, Fig.n° 48, et les granulations spécifiques apparaissent groupées soit en couronne soit en croissant autour du noyau. On détermine le pourcentage des cellules, dont le voile ainsi dégagé représente au moins 20 % du diamètre cellulaire par rapport aux macrophages totaux, sur une population de 100 cellules au moins comptées sur un minimum de trois fragments pulmonaires. Nous appelons cette valeur indice de réactivité cytoplasmique.

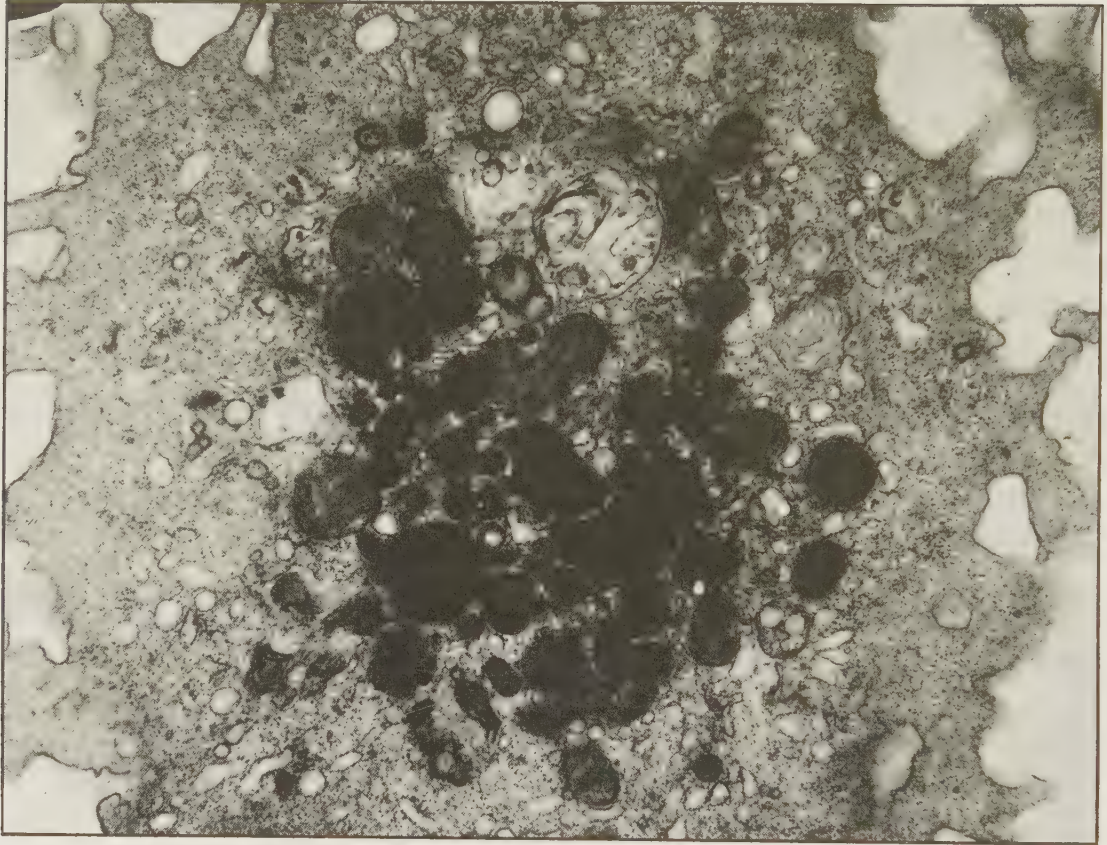


Fig. n° 48

Grossissement 17.400 - Macrophage alvéolaire après incubation dans le liquide de Mac-Coy - Une zone hyaloplasmique importante se développe à la périphérie cellulaire. Les inclusions se regroupent au centre de la cellule.

Population alvéolaire

Le tableau n° 12 permet d'apprécier l'influence des toxiques sur les différents paramètres mesurés. Le plutonium, même à dose faible, diminue de manière très sensible le nombre de macrophages extraits du poumon. Cette variation ne peut s'expliquer par une réaction cellulaire puisque la fraction d'hématite extraite ne varie que faiblement dans les deux séries : Tableau n° 13

L'aptitude à la synthèse d'ADN disparaît presque totalement aux fortes doses de plutonium, et décroît de plus de la moitié de sa valeur pour les faibles doses. Les modifications ne s'accompagnent pas de l'apparition notable de cellules inflammatoires en dehors de quelques lymphocytes. L'influence de la silice est entièrement différente : la population alvéolaire est nettement augmentée, les cellules en phase de synthèse sont nombreuses et des polynucléaires apparaissent dans l'alvéole. Tableau n° 12.

Modifications fonctionnelles

Les modifications apparaissent dans les tableaux 12 et 13.

Le plutonium à faible dose et la silice entraînent une importante diminution du nombre de macrophages capables de phagocyter l'hématite et une chute de l'indice de réactivité cytoplasmique. On n'observe pas de modifications de ces paramètres avec le plutonium à faible concentration.

L'excrétion bronchique paraît dans le tableau I. Dans tous les cas d'intoxication, on constate que l'excrétion décroît par rapport aux témoins.

IV.7.2. - Discussion - conclusions

L'homéostasie de la population alvéolaire dépend d'au moins trois facteurs essentiels :

L'apparition de cellules nouvelles, l'élimination par remontée bronchique et la mort cellulaire in situ.

Dans les conditions physiologiques, nous l'avons vu, les différents paramètres sont coordonnés et la population cellulaire varie peu. L'inhalation de plutonium à faible dose provoque des modifications qui sont compensées, la population décroît, le nombre de macrophages excrétés décroît de façon proportionnelle et la cinétique d'épuration n'est pas altérée. Le plutonium à forte con-

TABLEAU 12

	Macrophages 10^6	Macrophages/ Cellules totales 10^2	Macr.phase.S./ Macr. totaux 10^3	Macr. étalés / Macr. totaux 10^2	Macr. excrétés/ 24h 10^6
Témoins ♂ Hiver	8,03 σ 1,46	94,50 σ 2,13	42,60 σ 11,40	35,22 σ 13,70	0,70 σ 0,17
♂ ^{239}Pu 0,1 $\mu\text{Ci/g}$ Hiver	3,05 σ 0,79	87,12 σ 7,88	1,00 σ 0,86	10,10 σ 5,90	0,18 σ 0,07
♂ ^{239}Pu 0,007 $\mu\text{Ci/g}$ Hiver	6,02 σ 0,74	90,32 σ 3,60	19,75 σ 8,28	34,55 σ 12,22	0,48 σ 0,13
Témoins ♀ Eté	13,76 σ 4,97	93,75 σ 2,36	45,83 σ 13,93	26,83 σ 12,28	1,57 σ 0,49
♀ Silice Eté	26,50 σ 10,73	63,41 σ 16,83	98,33 σ 19,69	5,00 σ 2,98	1,12 σ 0,45

TABLEAU 13

	T-To hématite	A ¹¹⁰ Fe ⁵⁹ rinçage / A ¹¹⁰ totale Pulmonaire	Macr. hématite / Macr. totaux
Témoins ♂	2. 10j	30,65 σ 8,78	76,50 σ 6,69
♂ ²³⁹ Pu 0,1 µCi/g	2. 10j	24,88 σ 6,10	53,21 σ 3,74
Témoins ♂	15. 20j	41,70 σ 10,60	88,50 σ 6,70
♂ ²³⁹ Pu 0,007 µCi/g	15. 20j	35,45 σ 6,60	92,40 σ 5,60
Témoins ♀	15. 20j	39,33 σ 12,58	86,50 σ 6,63
O Silice	15. 20j	33,66 σ 6,30	53,00 σ 5 17

centration provoque une diminution de l'excrétion cellulaire plus importante que la chute du nombre total des macrophages dans le poumon. La silice provoque une augmentation du nombre des macrophages qui n'est pas compensée par l'augmentation de l'excrétion. Les observations permettent d'affirmer que le nombre des cellules alvéolaires n'est pas le facteur essentiel de l'épuration. L'examen histologique des tissus et la valeur du taux d'hématite extractible permettent d'éliminer l'influence d'une réorganisation tissulaire constituant un obstacle à l'épuration. Il semble donc que l'on doit rechercher dans des troubles de la mobilité ou de la mobilisation cellulaire le facteur déterminant. Les "variations de l'indice de réactivité cytoplasmique" que nous présentons sont un argument en cette faveur. FAUVE et al. (1968) [64] ont montré en effet une étroite corrélation entre la mobilité et l'aptitude à l'étalement des macrophages. La restauration cellulaire observée après intoxication au plutonium précède la restauration de l'excrétion du ⁵⁹Fe, toutefois les conditions dans lesquelles nous avons pu observer le phénomène, c'est à dire de 45 à 85 jours après l'inhalation du plutonium à forte activité, ne permettent pas d'établir une relation entre les deux restaurations (Tableau 14). Ceci peut s'expliquer par la diminution de l'hématite extractible et par l'examen histologique. De nombreuses cellules ont gagné les parois et les gaines, et la fraction disponible pour l'excrétion ne représente plus qu'un faible pourcentage de l'activité totale pulmonaire. Cette restauration cellulaire traduite par l'aptitude à la synthèse est précédée de l'apparition de petits macrophages lymphocytoïdes dont POLICARD et al. (1963) [168] avaient souligné la parenté morphologique avec les cellules évoluées. Ces cellules ont un indice d'incorporation très faible. Leur présence coïncide avec celle d'une population de macrophages typiques pratiquement dépourvues d'hématite et de plutonium qui sont par contre fréquemment marquées en autoradiographie. Il paraît ainsi vraisemblable qu'il existe une source extraalvéolaire de cellules qui assurent le remplacement des cellules.

Cette cellule pourrait être du même type que les cellules lymphocytoïdes origine des macrophages décrite par HOWARD et coll. (1969) [98]. Ce type cellulaire est différent des lymphocytes à vie longue, CUDKOWICZ et coll (1964) [54], et pourrait être identifié avec des cellules souches capables dans certains cas de quitter leur site médullaire pour évoluer dans les tissus.

TABLEAU 14

Restauration cellulaire après inhalation de plutonium à forte contamination

durée depuis l'inhalation de plutonium	Nombre de Macrophages	Hématite extractible en %	Indice d'incor- poration de Thymidine en %	Indice de phagocytose en %	Réactivité cyto- plasmique
46 J	9.5	29.2	32	23.2	12
46 J	4.5	22.3	30	21	17
67 J	6.2	10.3	15	42	26
68 J	18.5	13.2	21	36	28
85 J	9.3	30.3	31	49	
85 J	5.4	18.4	9	53	

IV.8 - Régulation humorale

L'introduction de silice dans l'alvéole se traduit par une augmentation de l'indice de marquage des macrophages alvéolaires. Nous nous proposons de rechercher si ce phénomène met en jeu un mécanisme humoral.

Six paires de rats parabiontes sont réalisées et testées selon le protocole décrit dans le chapitre III.8.2 à partir de femelle OFE de 300 g ; six paires de rats sont également réalisées à partir de 6 rats intoxiqués à la silice depuis 1 mois et groupés avec 6 partenaires de même poids. Le pourcentage de cellules en phase de synthèse est recherché dans les conditions décrites précédemment.

Résultats

Chez les animaux témoins en parabiose ce pourcentage s'établit à 3,7 % avec un écart type de 0,9.

Les résultats du groupe silice apparaissent dans le tableau suivant. (Tableau 15).

TABEAU 15

Paire n°		Nombre de cellules extraites	% de cellules marquées
1	Silice	$57,2 \times 10^6$	2,9
	Hôte	$9,3 \times 10^6$	4,3
2	Silice	$22,6 \times 10^6$	4,4
	Hôte	$12,1 \times 10^6$	5,8
3	Silice	$30,1 \times 10^6$	2,7
	Hôte	$8,2 \times 10^6$	4,2
4	Silice	$29,6 \times 10^6$	7,4
	Hôte	$12,7 \times 10^6$	4,6
5	Silice	$3,7 \times 10^6$	5,1
	Hôte	$7,9 \times 10^6$	3,8
6	Silice	$44,1 \times 10^6$	3,2
	Hôte	$8,9 \times 10^6$	5,6

Discussion - Conclusion

L'existence de facteurs favorisant la mitose a été recherchée par parabiose avec des résultats différents selon les auteurs, en particulier dans le phénomène de régénération du foie après hépatectomie partielle BUCHER (1951) [30], HUROWITZ et STUDER (1960) [100] concluent à l'existence d'un facteur humoral tandis que ce résultat n'est pas retrouvé par ROGERS et coll (1961)

D'autre part GOLDENBERG et coll (1968) [76] ont montré l'étroite dépendance des poumons chez deux parabiontes lorsque l'un des rats était soumis à l'irradiation.

Les résultats que nous observons sont difficiles à interpréter. Pour le lot témoin de parabiontes le pourcentage de cellules marquées est significativement différent des animaux maintenus dans des conditions normales de vie, ce qui indique que l'état de parabiose introduit un paramètre supplémentaire dans l'expérimentation.

Les hôtes des animaux intoxiqués à la silice ont un pourcentage de marquage moyen de 4,7 non significativement différent des animaux maintenus dans des conditions standard mais significativement différent du lot des témoins de parabiose.

Les animaux intoxiqués à la silice ont un pourcentage de cellules marquées de 4,3 non significativement différent du lot de rats hôtes mais très significativement différent du lot de rats intoxiqués à la silice et non soumis à la parabiose.

Tous ces résultats sont en faveur d'une corrélation humorale complexe du renouvellement cellulaire dans l'alvéole, mais ils ne permettent pas de déterminer la nature exacte de ce phénomène.

DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS

A condition de définir rigoureusement les paramètres de l'expérience, la population de macrophages alvéolaires du rat apparaît comme une constante biologique.

Il existe des fluctuations individuelles sans doute importantes mais suffisamment faibles, néanmoins, pour que l'influence des paramètres généraux comme le sexe, la saison, la lignée et l'état microbiologique se manifeste de manière significative ou très significative.

Il existe deux modalités par lesquelles la population peut varier dans les conditions physiologiques : la variation de l'excrétion des cellules par remontée bronchique, la variation du nombre de cellules nouvelles apparues dans l'alvéole : l'examen des résultats que nous présentons montre que deux paramètres demeurent pratiquement constants, en particulier en fonction du sexe, et de la saison dont nous avons vu l'importance sur la population alvéolaire. Ce sont : la période d'excrétion des cellules mesurée par l'excrétion de la poussière marquée, et le pourcentage de cellules en phase de synthèse, exception faite, cependant, pour les rats Germ-Free.

De ces résultats on peut conclure que l'excrétion des cellules est un phénomène aléatoire affectant un pourcentage constant des cellules présentes dans le sac alvéolaire et indépendant du nombre total de ces cellules. Le facteur essentiel de l'homéostasie est donc l'apport de cellules nouvelles.

La constance du pourcentage de cellules en phase de synthèse implique que le nombre total de cellules synthétisant l'ADN varie de manière proportionnelle à la population totale. Il s'agit là très certainement d'une corrélation liée à l'environnement cellulaire et capable de modifier dans une certaine mesure l'effet de la migration des monocytes du sang vers l'alvéole.

Dans certaines conditions pathologiques comme dans le cas de l'em-poussiérage à la silice, nous montrons que le pourcentage de cellules en phase de synthèse augmente de manière très importante. Le nombre total de cellules dans l'alvéole augmente lui aussi de sorte que dans nos conditions expérimentales le nombre total des cellules en phase "S" apparaît multiplié par un

facteur 4. Sans doute, ainsi que l'ont montré de nombreux auteurs, depuis l'observation princeps de PERMAR (1920) [161], ce phénomène est-il consécutif à l'augmentation des migrations de cellules depuis le vaisseau sanguin jusque dans l'alvéole. Néanmoins on sait en particulier par les travaux de VANFURTH et coll. (1968-1970) [209/210] que le monocyte sanguin n'est pas capable de synthétiser l'ADN. Il faut donc admettre qu'il acquiert cette propriété dans l'alvéole comme il peut l'acquérir également dans le tissu inflammatoire, NORTH (1969) [159], RYAN et SPECTOR (1970) [180], ou dans les réactions de rejet, HOWARD et coll. (1969) [98]. Il n'est donc pas étonnant que cette possibilité dépende des conditions écologiques ou biochimiques de l'alvéole. En ce qui concerne plus particulièrement la silice, HEPPELSTON (1970) [91], suggère que ce toxique a une action de stimulant des mitoses. Ses résultats expérimentaux ne lui permettent pas d'étayer son hypothèse, par contre nos résultats sont très en faveur de ce point de vue : soit qu'il s'agisse d'un facteur stimulant vrai, soit qu'il s'agisse de l'inhibition d'un facteur répressif. L'augmentation des cellules en phase de synthèse chez l'hôte parabionte d'un animal intoxiqué à la silice sans modification importante de la population alvéolaire totale suggère que le facteur stimulant des mitoses peut être transporté par voie sanguine.

L'utilisation de la mesure de l'élimination par remontée bronchique d'une poussière radioactive inhalée permet de caractériser une phase décrite par une simple exponentielle et différente de l'excrétion par remontée ciliaire. Il s'agit là d'un véritable test, la fonction d'excrétion des macrophages du poumon qui peut être comparée à la fonction colloïdopexique analysée par la méthode de la clearance du carbone colloïdal, HALPERN (1950) [86], BIOZZI et coll. (1953) [18], pour les macrophages du milieu intérieur. Il s'agit là néanmoins d'un phénomène beaucoup plus lent où la période T ($= \frac{0,693}{K}$) s'exprime en jours et non plus en minutes. La modification de cette fonction^K qui se traduit par un allongement de la période est caractéristique des pneumoconioses toxiques-Silice et Plutonium dans notre étude-NENOT et coll. (1970) [156], LE BOUFFANT et coll. (1970) [119].

L'existence d'une cinétique d'excrétion décrite par une fonction du premier ordre permet de déterminer avec une bonne précision l'ensemble des macrophages intraalvéolaires du poumon du rat normal. On constate que cette mesure affecte de $20 \text{ à } 39 \times 10^6$ des cellules du poumon de rat.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ADDISON T. (1843)
Observations on pneumonia and its consequences
Guy's Hosp. Rep.
- 2) ADDISON W. L. (1842)
On the ultimate distribution of the air passages and the formation of the air cells of the lungs.
Phil. trans.
- 3) ADLERSBERG L. (1969)
Redistribution and elimination of intravenously injected latex particles in mice.
J. Reticulo-endothel. Soc. , 6 , 536-560.
- 4) ALBERT R. E. ARNETT L. C. (1955)
Clearance of radioactive dust from the human lung.
Arch. Ind. Health , 12, 99-106 .
- 5) ASCHOFF L. (1924)
Das reticulo-endotheliale System.
Ergebn. inn. Med. Kinderh., 26, 1-118 .
- 6) ASCHOFF L. (1926)
Z. ges. exp. Med, 50, p. 52 .
- 7) BAIR W. J. (1960)
Deposition, retention, translocation and excretion of radioactive particules.
In : Inhaled particules and vapors, Oxford, March 29-April 1, 1960.
DAVIES, C. N. , Ed.- Oxford, Pergamon Press, 1960, pp. 192-207.
- 8) BALNER H. (1963)
Identification of peritoneal macrophages in mouse radiation chimeras.
Transplantation, 1, 217-223.
- 9) BAUER H. (1966)
The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response.
J. exp. Med. , 123, 1013-1024.
- 10) BAUER, H. (1968)
Cellular defence mechanisms in germ-free animals.
In : The germ-free animal in research (COATES, M. E. Ed.).
New-York, Academic Press, pp. 210-226.
- 11) BAZIN J. P. , MARCHADIER B. , LAFUMA J. (1968)
Traitement mathématique de données métaboliques liées à la théorie des compartiments.
In : 1er Congrès européen sur la protection contre les rayonnements ..
Menton, 9-11 Oct. 1968.
Le Vésinet, SCPRI, 1971, pp. 374-380.
- 12) BELL E. , SHAND F. (1970)
Origine lymphocytaire des macrophages

Colloque sur les fonctions immunologiques des macrophages.
Institut PASTEUR, 15 Octobre 1970 (Voir Annales I. P.)

- 13) BENNETT B., (1966)
Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse.
Am.J.Path., 48, 165-181.
- 14) BERTALANFFY F.D., LEBLOND C.P. (1953)
The continuous renewal of the two types of alveolar cells in the lung of the rat.
Anat. Rec., 115, 515-541.
- 15) BERTALANFFY F.D. (1964)
Respiratory tissue : structure, histophysiologie cytodynamics, Part I
Review and basic cytomorphology
Inst. Rev. cytol. 16, 233-328
- 16) BERTALANFFY F.D., (1968)
Dynamics of cellular population
In : The Lung, (LIEBOW A. et SMITH D.E., Eds.)
Baltimore, Williams and Wilkins, pp. 19-30.
- 17) BESCOT-LIVERSAC J. (1960)
Radioisotopes en histochimie.
conférence Faculté de médecine, Paris .
- 18) BIOZZI et Coll. (1953)
Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system.
Brit. J. exp. Path., 34, 441-457.
- 19) BLOOM W., (1927)
Transformation of lymphocytes of thoracic duct into polyblasts (macrophages) in tissue culture.
Proc. Soc. exp. biol. Med., 24, 567-569.
- 20) BLOOM W., (1938)
Lymphocytes and monocytes : theories of hematopoiesis
In : Handbook of hematology, vol. 1 (DOWNEY H. Ed.),
New-York, Hoeber, pp. 374-435.
- 21) BOAK, J.L., CHRISTIE G.H., FORD W.L., et Coll. (1968)
Pathways in the development of liver macrophages : alternative precursors contained in populations of lymphocytes and bone marrow cells.
Proc. Roy. Soc., 169, B, 307-327.
- 22) BOWDEN D.H., ADAMSON, I.Y.R., GRANTHAM W.G., WYATT J.P. (1969)
Origin of lung macrophage : evidence derived from oxygen and radiation induced injuries.
Amer. J. Path., 55, 44-

- 23) BRAIN, J. D. , (1970)
The effects of increased particles on the number of alveolar macrophages.
In : Inhaled particles III, London, September 21-23, 1970 (à paraître).
- 24) BRAIN, J. D. , FRANCK, N. R. , (1968)
The relation of age to the number of lung free cells, lung weight and body weight in rats.
J. Gerontol. , 23, 58-62.
- 25) BRAUNSTEINER, H. , PAERTON J. , THUMB N. , (1958)
Studies on lymphocytic function.
Blood, 13, 417-426.
- 26) BRIEGER H. , (1963)
The fate of inhaled particles . Early and late post-exposure periods.
Arch. Environ. Health, 6, 57-60.
- 27) BRISCOE J. C. , (1908)
An experimental investigation of the phagocytic action of the alveolar cells of the lung.
J. Path. Bact. , 12, 66-100.
- 28) BRODERSEN J. (1933)
Über die Staub-,Körner-,und Schaumzellen der Lunge und ihre Funktion.
Z. mikr. anat. Forsch. 32, 73-83.
- 29) BRYANT, R. E. , DESPREZ R. M. , VAN MAY M. H. , ROGERS D. E. (1966)
Study on human leukocyte motility. Effects of alterations in pH, electrolyte concentration and phagocytosis on leukocyte migration, adhesiveness and aggregation.
J. exp. Med. , 124, 483-499 .
- 30) BUCHER N. L. R. , SCOTT J. F. , AUB, J. C. , (1951)
Regeneration of the liver in parabiotic rat.
Cancer Res. 11, 457-465.
- 31) BUCKINGHAM S. , HEINEMANN H. O. , SOMMERS, S. C. et Coll. (1966)

Phospholipid synthesis in the large pulmonary alveolar cell; its relation to lung surfactants,
Am. J. Path, 48, 1027-1041.
- 32) BULLOUGH, W. S. (1955)
Hormone and mitotic activity.
Vitamins Hormones, 13, p.261 .
- 33) CAPPELL D. F. (1929)
Intravital and supravital staining. III. The nature of the normal living of the pulmonary alveoli and the origin of the alveoli phagocytes in the light of vital and supravital staining.
J. Path. Bact. , 32, p. 675-707 .

- 34) CARLETON H. M. , (1934)
Studies on epithelial phagocytosis. II. A method for demonstrating the origin of dust cells.
Proc. Roy. Soc. , 114, B, 513-523.
- 35) CARO L. G. , VAN TUBERGEN R. P. , (1962)
High resolution autoradiography. I. methods.
J. Cell. Biol. , 15, 173-188.
- 36) CARREL, A. , EBELING A. H. (1926)
The fundamental properties of the fibroblast and the macrophage.
J. exp. Med. , 44, 285-305.
- 37) CASARETT L. J. , METZGER G. V. , CASARETT M. G. (1967)
Cytodynamics of rat lung in response to Freund's adjuvant.
in : DILUZIO N. R. , Ed. The Reticulo-endothelial system and atherosclerosis
Plenum Press, pp.108-119.
- 37-1) CASARETT L. I. MILLEY P. S. (1964)
Alveolar reactivity following inhalation of particules.
Health phys. , 10, 1003-1011.
- 38) CAULET T. ADNET J. J. HOPFNER C. LEGEAY G. (1969)
Les cellules à inclusion lipidique de la bordure de l'alvéole pulmonaire.
Etude histochimique et ultrastructurale.
Path. Biol. 17, 165-173.
- 39) CEMBER H. HATCH T. F. WATSON J. A. GRUCCI T. (1956;1955;1954)
1-The elimination of radioactive barium sulfate particles from the lung.
2-Pulmonary effects from radioactive barium sulfate dust. 3-Pulmonary penetration of particles administered by intratracheal insufflation.
Arch. Ind. Health, 13, 170-176; 12, 628-634 ; 10, 124-129.
- 40) CEMBER H. , WATSON J. A. et NOVAK M. E. (1961)
The influence of radioactivity and lung burden on the pulmonary clearance of barium sulfate.
Am. Ind. Hyg. Ass. J. 22, 27-32.
- 41) CESA-BIANCHI D. (1913)
Staub Inhalation und Lungen Tuberkulose, experimentelle Untersuchungen.
Z. Hyg. Infekt Kr. , 73, 166-181.
- 42) CHANG Y. T. (1964)
Long term cultivation of mouse peritoneal macrophages.
J. Nat. Cancer Inst. , 32, 19-35.
- 43) CHARBONNIER J. LE BOUFFANT L. (1960)
Dispositif et méthode pour l'étude de l'élimination de poussières inhalées chez le rat.
L'épuration pulmonaire : Extrait du compte-rendu des journées françaises,
p. 99-120.

- 44) CHARCOT J. M. (1887)
Maladie des poumons. Paris.
- 45) CLARA M. (1936)
Vergleichende Histobiologie des Nierenglomerulus und der Lungen Alveoli.
Z. mikr. anat. Forsch., 40, 147.
- 46) CLARK E. R. et CLARK E. L. (1930)
Relation of monocytes of the blood to the tissue macrophages.
Am. J. Anat., 46, 149-185.
- 46-1) CLIFF W. J. (1966)
The behaviour of macrophages labelled with colloidal carbone during
wound healing in rabbit ear chambers.
Quart. J. exp. Physiol., 51, 112-119.
- 47) COHN Z. A. FEDORKO M. E. HIRSCH J. G. (1965)
The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation
of macrophages lysosomes.
J. exp. Med., 123, 757-773.
- 48) COLLET A., REUET-NORMAND C. (1967)
Aspect infrastructural de la traversée de la paroi alvéolaire du poumon
des cellules migratrices.
Sem. Hôp., 29, 1928-1937.
- 49) COLLET A. DEVULDER B. NORMAND-REUET C. (1967)
Etude infrastructurale des lésions pulmonaires expérimentales par
Mycobacterium kansasii associé aux poussières chez le cobaye.
Rev. Tuberc. Pneumol., 31, 727-748.
- 50) COLLET A. MARTIN J. C. NORMAND-REUET C. POLICARD A. (1966)
Recherches infrastructurales sur l'évolution des macrophages alvéolaires
et leurs réactions aux poussières minérales.
In : Inhaled particles and vapors. II. Cambridge, Sept. 28-Oct. 1, 1965
(DAVIES C. N., Ed.)
Oxford, Pergamon Press, pp. 155-165.
- 51) CONNING D. M. HEPPLESTON A. G. (1966)
Reticuloendothelial activity and local particle disposal. A comparaison of
the influence of modifying agents.
Exp. J. Path., 47, 388-400.
- 52) CORRIN B. (1969)
Phagocytic potential of pulmonary alveolar epithelium with particular
reference to surfactant metabolism.
Thorax, 24, p. 110
- 53) CRONKITE, E. P., BOND V. P., FLIEDNER T. M., KILLMANN S. V.
(1960)
Haemopoiesis.
In : Ciba Foundation Symposium on haemopoiesis, cell production and
its regulation.
Londres, Churchill, p. 70 .

- 54) CUDKOWICZ G., UPTON A. G., SHEARER G. M., HUGHES W. L. (1964)
Lymphocyte content and proliferative capacity of serially transplanted mouse bone marrow.
Nature, 201, 165-167.
- 55) DANNENBERG A. M. Jr, ROESSLER W. G., MEYER O. T., CHANDRON-SEKHAR S., KAMBARA T. (1970)
Radiation infection and macrophages function, III Recovery from the effects of radiation illustrated by dermal B. C. G. lesions; resistance of pulmonary alveolar macrophage ...
J. reticuloendothel. Soc., 7, 91-108.
- 56) DELAUNAY (1970)
Colloque sur les fonctions immunologiques des macrophages;
Section d'immunologie de la Société Française de Microbiologie.
(Introduction). Paris, Inst. Pasteur.
- 57) DOMINICI D. (1920)
Etude sur le tissu conjonctif et les organes hématopoïétiques des mammifères.
Arch. Anat. microsc., 17, 3, 83, 247.
- 58) DRINKER C. K. SHAW L. K. (1920)
Quantitative distribution of particulate material.
J. exp. Med., 31, 77.
- 59) EBERTH C. J. (1864)
Zu den Kontroversen über das Lungenepithel.
Würzburger Natur w. Z., 5,
- 60) EBERT R. H. FLOREY H. W. (1939)
The extravascular development of the monocyte observed in vitro.
Brit. J. exp. Pathol. 20, 342-356.
- 61) EDWARDS J. L., KLEIN R. E. (1961)
Cell renewal in adult mouse tissues.
Am. J. Path., 5, 437-453.
- 62) ELENZ E. (1863)
Ueber das Lungenepithel.
Würzburger Natur w. Z., 5
- 63) ELIOT G. (1926)
The origin of phagocyte cells in the rabbit
Bull. J. Hopkins Hospital, 39, 149.
- 64) FAUVE R. M. DEKARIS D (1968)
Macrophages spreading : inhibition in delayed hypersensitivity.
Science, 160, 795-796.

- 65) FEDORKO M. E. , HIRSCH J. G. , COHN Z. A. (1968)
Autophagic vacuoles produced in vitro. Studies on cultured macrophages exposed to chloroquine.
J. Cell Biol., 8, 377-391.
- 66) FERIN J. (1970)
Emphysema in rats and clearance of dust particles.
In : inhaled particles III, London, September, 21-23, 1970.
(à paraître)
- 67) FERIN J. (1965)
Pulmonary clearance and the function of macrophages.
Arch. environ. Health, 10, 790-795.
- 68) FERIN J. (1967)
L'épuration pulmonaire des particules insolubles.
Poumon Coeur, 23, 1249-1254.
- 68-1) FETZER J. (1967)
Speicherung von Polyvinylpyridin-N-oxid in Lysosomen.
Naturwiss., 54, 518-519.
- 69) FOOT, N. C. (1920)
Studies on endothelial reactions. II. The endothelial cell in experimental tuberculosis.
J. exp. Med., 32, 513-531.
- 70) FREY-WYSSLING A. (1953)
Submicroscopic morphology.
London, pp. 2.
- 71) FRIBERG L. , HOLMA B. , (1961)
External measurement of lung clearance.
Arch. Environ. Health, 3, 420-425.
- 72) FRIBERG L. HOLMA B. (1967)
Etudes expérimentales de l'épuration pulmonaire d'aérosols radioactifs à l'aide du balayage de profil et du comptage intéressant la totalité de l'organisme.
Poumon, Coeur, 23, 1279-1290 .
- 73) FRIED B. M. (1934)
The lungs and the macrophage system.
Arch. Path., 17, 76-103.
- 74) GERSING R. SCHUMACHER H. (1955)
Experimentelle Untersuchungen über die Staub Phagocytose.
Beitr. Silikose Forsch., 25, 31 .

- 75) GIESEKING R. (1958)
Aufnahme und Ablagerung von Fremdstoffen in der Lunge nach elektrone-
noptischen Untersuchungen.
Ergebn. allgem. Pathol. , 38, 92-126.
- 76) GOLDENBERG V. E. , WARREN Sh., CHUTE R. (1968)
Radiation pneumonitis in single and parabiotic rats.
Lab. Invest. , 18, 215-226.
- 77) GOODMAN J. W. (1964)
On the origin of peritoneal fluid cells.
Blood, 23, 18-26.
- 78) GORER P. A. , O'GORMAN P. (1956)
The cytotoxic activity of isoantibodies in mice.
Transpl. Bull. , 3, 142-143.
- 79) GOUGH J. (1965)
The formation of macrophages from lymphocytes in vitro.
Exp. Cell. Res. , 38, 476-482.
- 80) GREEN G. M. (1969)
The response of the alveolar macrophages system to host and environmental
changes.
Arch. Environ. Health, 18, 548-550.
- 81) GROSS F. (1927)
Ziegler's Beitr. , 76, p. 374.
- 82) GROSS P. , De TREVILLE R. T. P. , TOLKER E. B. , KASCHAK M.
BABYAK M. A. (1969)
The pulmonary macrophage response to irritants.
Arch. Environ. Health, 18, 174-185.
- 83) GRÜNSPAN M. , ANTWEILLER H. (1970)
Biochemical and biophysical reactions of rat lung tissue to quartz and
corundum with and without PVPN oxide treatment.
In : Inhaled particles. III, London, sept. 21-23, 1970 (à paraître)
- 84) GUARNERI J. J. , LAURENZI G. A. (1968)
Effect of alcohol on the mobilization of alveolar macrophages.
J. lab. clin. Med, 72, 40-51.
- 85) GUIEYSSE, PELISSIER M. A. (1920)
Modifications et lésion des cellules épithéliales pulmonaires dues aux gaz
suffocants.
C. R. Acad. Sci. Paris, 170, 1411.
- 86) HALPERN B. N. (1950)
Cinétique de l'activité granulopexique du système réticulo-endothélial en
fonction de la dose d'encre de chine injectée.
C. R. Soc. Biol. , 144, 234-237.

- 87) HAN, S.H. (1966)
Studies on tuberculin sensivity.
Ph.D.Thesis, University of Washington, Seattle.
- 88) HAPKE E.J. PEDERSON H.J. (1968)
Cytoplasmic activity in type I pulmonary epithelial cells induced by macroaggregated albumin.
Science, 161, 580-582.
- 89) HATCH T.F. GROSS P. (1964)
Pulmonary deposition and retention of inhaled aerosols.
New-York, Academic Press.
- 90) HEPPLESTON A.G. (1963)
The disposal of inhaled particulate matter. A unifying hypothesis.
Am. J. Path, 42, 119-131.
- 91) HEPPLESTON (1970)
Observation on the mechanism of silicotic fibrogenesis inhaled particles III, London, September 16-23, 1970 (à paraître)
- 92) HERXHEIMER (1903)
Ziegler's Beitr. 33, 363.
- 93) HILSCHER W. MAURER W. (1962)
Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und ihres Zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit ¹⁴C und ³H - Thymidine.
Naturwiss., 49, 352.
- 94) HIRSCH J.G. FEDORKO M.E. (1968)
Ultrastructure of human leukocytes after simultaneous fixation with glutaraldehyde and osmium tetroxide and post fixation in uranyl acetate.
J. Cell. Biol., 38, 615-627.
- 95) HOLMA B. (1969)
Scanning electron microscopic observation of particles deposited in the lung.
Arch. Environ. Health, 18, 330-336.
- 96) HOWARD J.G. (1964)
Stimulation of the Kupffer cells during graft-versus-host reaction in the mouse : its use, significance and modification (Abstract.)
J. Reticuloendoth. Soc., 1, 360.
- 97) HOWARD J.G. CHRISTIE G.H. BOAK J.L. EVANS-ANFOM E. (1965)
in : La greffe des cellules hématopoïétiques allogéniques,
Paris, 7-9 sept. 1964
Paris, C.N.R.S., 95-102
Evidence for the conversion of lymphocytes into liver macrophages during graft-versus-host reaction.

- 98) HOWARD J.G., CHRISTIE G.H., BOAK J.L., KINSKY R.G. (1969)
Peritoneal and alveolar macrophages derived from lymphocyte population during graft-versus-host reaction.
Brit. J. exp. Path., 50, 448-455.
- 99) HUNT W.R. Jr, MYRVIK Q.N., (1964)
Demonstration of antibodies in rabbit alveolar macrophages with failure to transfer antibody production.
J. Immunol, 93, 677-681.
- 100) HUROWITZ R.B., STUDER A. (1960)
Effect of partial hepatectomy on mitosis rate in CCl₄ induced liver damage of parabiotic rats.
Arch. Path., 69, 511-515.
- 101) IRWIN D.A. (1932)
Küpferr cell migration.
J. Can. med. Ass., 27, 130.
- 102) KARRER H. E. (1958)
The ultrastructure of the mouse lung. The alveolar macrophage.
J. bioph. bioch. Cytol., 4, p. 693.
- 103) KARRER H. E. (1960)
Electron microscopic study of the phagocytosis process in lung.
J. bioph. bioch. Cytol., 7, 357.
- 104) KILBURN K. M. (1969)
Alveolar clearance of particles. A bullfrog lung model.
Arch. Environ. Health, 18, 556-563.
- 105) KIUSKY R.G., CHRISTIE G.M., ELSON J., HOWARD J.G. (1969)
Extra-hepatic derivation of Kupffer cells during oestrogenic stimulation of parabiosed mice.
Brit. J. exp. Path. 50, 438-447.
- 106) KIYONO K. (1914)
Zur Frage der histiozytären Blutzellen.
1 - Folia Hematol. 18, 149.
2 - Die vitale Karminspeicherung, Jena, 1914.
- 107) KÖLLIKER, A. (1881)
Zur Kenntnis des Baues der Lunge des Menschen.
Verh. phys. med. Ges. Würzburg.
- 108) KOLOUCH F.J. (1939)
The lymphocyte in acute inflammation.
Amer. J. Pathol. 15, 413.
- 109) KREUGER A. P. (1944)
Amer. J. med. Sci., 207, 40 (cité par TALBOT et Coll).

- 110) LABELLE C.W., BRIEGER A. (1959)
Synergistic effects of aerosols.II. Effects on rate clearance from the lung.
Arch. Ind. Health, 20, 100-109.
- 111) LABELLE C.W. , BRIEGER H. (1960)
Patterns and mechanisms in the elimination of dust from the lung.
In : Inhaled particles and vapeurs, I, Oxford, 29 March, 1 April 1960
(DAVIES C.N., Ed.)
Oxford, Pergamon Press, 1961, pp356-365.
- 112) LADMAN A.J. , FINLEY T.N. (1966)
Electron microscopic observations of pulmonary surfactant and the cells
which produce it.
Anat. Rec., 154, 372 .
- 113) LAFUMA J. (1971)
Communication personnelle.
- 114) LAMBIN P. (1932)
Aspects histologiques de la fixation du dioxyde de Thorium dans les
organes.
C.R. Soc. Biol. 309, 66-69.
- 115) LANGE F.J.(1909) (cité par A. POLICARD)
dans : Le poumon.
Paris, Masson, 1955.
- 115-1) LANG (1926) (Cité par POLICARD)
Arch. exp. Zellforsch., 2 .
- 116) LAURENZI E.A. , POMER R.T. , KASS E.H. (1961)
Bacteriologic flora of the lower respiratory tract.
New Engl. J. Med., 265, 1273.
- 117) LAUTERBACH A.D. HAYES M.A. et COELHO (1956)
An improved generator.
Arch. Ind. Health, 13, p. 156 .
- 118) LEAKE E.S. , HEISE E.R. (1967)
Comparative cytology of alveolar and peritoneal macrophages from
Germ-free rats.
In : The reticuloendothelial system and atherosclerosis
(DI LUZIO, Ed.)
New-York, Plenum Press, 1967, pp.133-146.
- 119) LEBOUFFANT L. (1970)
Influence de la nature des poussières et de la charge pulmonaire sur
l'épuration.
In : inhaled particles and vapour .III. London, 21-23 Sept. 1970 (à paraître)

- 120) LEDER L.D. (1967)
The origin of blood monocytes and macrophages, review.
Blut, 16, 86-98
- 121) LEFEVRE G., NENOT J.C., LAFUMA J., COLLET A., CHARBONNIER J. (1968)
Méthode d'étude individuelle de l'épuration alvéolaire chez l'animal par aérosols radioactifs.
Arch. Mal. Prof. 29, 669-678.
- 122) LEFEVRE G. (1969)
Mise au point d'appareillage pour l'étude de l'épuration pulmonaire de poussières radioactives chez l'animal et exploitation automatique des résultats.
Mémoire du C.N.A.M., Paris, 1968.
- 123) LEMON W.S., HIGGINS G.H. (1935)
The tissue reactions of the lung to the intratracheal injection of particulate sericite. An experimental study.
Am. Rev. Tuberc. 32, 243-256.
- 124) LEWIS M.R., LEWIS W.H. (1925)

Am. J. Physiol., 72, 196.
- 125) LING (1968)
Lymphocyte stimulation
Amsterdam, North-Holland publ. Co, 1968.
- 126) LOW F.N. (1952)
Electron microscopy of the rat lung.
Anat. Rec., 113, 437.
- 127) LUBAROFF D.M., WAKSMAN B.H. (1968)
Identification of allogenic or hybrid cells by immuno fluorescence in passively transferred tuberculin reactions.
J. exp. Med., 128, 1437-1449.
- 128) LUFT U.C. (1961)
Improvement in epoxy resin embedding methods.
J. biophys. biochem. Cytol. 9, p. 409.
- 129) MACKANESS G.B. (1969)
The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo.
J. exp. Med., 129, 973-992.
- 130) MACKLIN C.C. (1938)
The silver lineation on the surface of the pulmonic alveolar walls of the nature cat, produced by applying weak silver nitrate solution and exposing

to sunrays or photographic developer
J. Thoracic Surg., 7, 536-551 .

- 131) MACKLIN C. C. (1947)
The foam cells of mammalian lungs with special reference to the vacuoloids.
Int. Congr. exp. Cytology, Stockholm, p. 383.
- 132) MACKLIN C. C. (1951)
The dust cells in the lungs of the albino mouse. Their structure relations and mode of action.
Lancet, 1, 432-435 .
- 133) MACKLIN, C. C. (1954)
The pulmonary alveolar mucoïd film and the pneumocytes.
Lancet, I, 1099-1104 .
- 134) MALLORY F. B. (1914)
The principles of pathological histology,
Philadelphia, Saunders, 1914 .
- 135) MALPIGHI (1697)
Opera ommia : de pulmonibus .
Lugo Batav .
- 136) MARSHALL A. H. E. (1946)
Observation on the pulmonary macrophage system .
J. Pathol. Bacteriol., 58, 729-738.
- 137) MARTIN J. C. (1971)
Communication personnelle (à paraître)
- 138) MASSE R. (1962)
Communication personnelle.
- 138-1) MASSE R., MARTIN J. C., ZAGORCIC A., LAFUMA J., LE BOUFFANT L. (1970)
Etude expérimentale de l'origine des macrophages alvéolaires du rat.
C.R. Acad. Sci. Paris, D, 270, 245-248 .
- 138-2) MASSE R. (1971)
(à paraître)
- 139) MATTER A., ORCI L., FORSJMAN W. G., ROUILLER Ch. (1968)
The stereological analysis of the fine structure of the micropinocytosis vermiformis in Küpffer cell of the rat.
J. Ultrastruct. Res., 23, 272-279 .
- 140) MAXIMOW A. (1903)
Experimentelle Untersuchungen über die entzündliche Neubildung von Bindegewebe.
Beitr. Path. Anat. allgem. Path., suppl. 5, 1; 34, 153 .

- 141) MAXIMOW A. (1924)
Relation of blood cells to connective tissue and endothelium.
Physiol. Rev., 4, 533-563.
- 141-1) MAXIMOW A. (1927)
In : Von MÖLLENDORFF W. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin, vol. 1, p.2.
- 142) MAXWELL, K. W., DIETZ T., MARCUS S. (1964)
An in situ method for harvesting guinea pig alveolar macrophages.
Amer. Rev. resp. Dis., 89, 579.
- 143) METCHNIKOFF E. (1884)
Über der Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen.
Virchow's Arch. Path. Anat., 97, 502 -527 . .
- 144) METCHNIKOFF E. (1888)
Über die phagozytäre Rolle der Tuberkelriesen.
Virchow's Arch. Path. Anat., 113, p. 63.
- 145) METCHNIKOFF E. (1892)
Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation.
Paris, Masson.
- 146) METCHNIKOFF E. (1901)
L'immunité dans les maladies infectieuses.
Paris
- 147) METZGER G. V., CASARETT L. J. (1967)
Some effects of divalent cations on in vitro phagocytosis.
Adv. exp. Med. Biol., 1, 163-174.
- 148) MILLER W. S. (1937)
The lung, 2. ed.
New-York, C.C.THOMAS, p. 70 .
- 149) MOORE R. D. SCHOENBERGER M. D. (1965)
Alveolar lining cells and pulmonary reticuloendothelial system of the rabbit.
Amer. J. Pathol., 45, 991-1006 .
- 150) MORROW P. E., GIBB F. R., GAZIOGLUK (1965)
The clearance of dust from the lower respiratory tract of man.
An experimental study .
In : inhaled particles and vapours. II. Cambridge, 28 sept. -1 oct. 1965,
(DAVIES C. N., Ed)
Oxford, Pergamon Press, pp.351-358 .
- 151) MOROSOVA , N. I. MOROKHOVA (1968)
The changes of the structure of the large alveolar cells in the process their transformation in the free alveolar macrophages and siderophages
Conference on electron microscopy, Roma, pp.515-517.

- 152) MOYER R. F. (1965)
Effect of whole body and partial body-X-irradiation on the extractable cellular components of the lung with special consideration to the alveolar macrophage.
These, University of California, Los Angeles, 1965, 116p.
- 153) MYRVIK Q. N. , LEAKE E. S. , FARIN B. (1961)
Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit, a technique to procure them in a high state of purity
J. immunol. , 86, p. 128.
- 154) NAEGELI O. (1931)
Verh. dtsch. Ges. immunol. Med. , 40, 511 .
- 155) NAKAO K. , MAO P. (1966)
A typical mitochondria of the intestinal absorptive cells of the germ-free rat .
Fed. Proc. , 25, 2, 1, 321 .
- 156) NENOT J. C. (1970)
Etude de l'influence de l'irradiation sur l'épuration pulmonaire .
In : Inhaled Particles and vapour . III. , London, 21-23 Sept. 1970 .
(à paraître)
- 157) NICOL, T. et BILBEY D. L. J. , (1958)
Elimination of macrophage cells of the reticuloendothelial system by way of the bronchial tree .
Nature, 182, 192 .
- 158) NICOL T. , et CORDINGLEY, J. L. (1967)
The reticuloendothelial excretion via the bronchial tree
The reticuloendothelial system. III.
New-York, Plenum Press, (DI LUZIO N. R. , PAOLETTI R. , Ed.), vol. 1, pp. 58-62 .
- 159) NORTH, R. J. (1969)
Cellular kinetics associated with the development of acquired cellular resistance .
J. exp. Med. 130, 299 .
- 160) OSMOND, D. G. , EVERETT, N. B. (1964)
Radioautographic studies of bone marrow lymphocytes in vivo and in diffusion chamber cultures .
Blood, 23, 1-17 .
- 161) PERMAR H. H. , (1920)
The development of the mononuclear phagocyte of the lung .
J. med. Res. , 42, 147-162 .
- 162) PINKETT, M. O. , COWDREY C. R. , NOWELL P. C. (1966)
Mixed hematopoietic and pulmonary origin of alveolar macrophages .
Amer. J. Pathol. , 48, 859-867 .

- 163) POLICARD A. , DEPLA S. (1917)
Les constituants cellulaires du tissu de bourgeonnement en évolution normale ou pathologique chez l'homme.
C.R. Soc. Biol., 80, 745.
- 164) POLICARD A. (1926)
Sur la nature du revêtement des alvéoles pulmonaires des mammifères
Bull. Hist. appl., 3, 236 .
- 165) POLICARD A. (1965)
Le poumon, structures et mécanismes à l'état normal et pathologique .
Paris, Masson.
- 166) POLICARD A. (1957)
The morphology and physiology of reticulohistiocytic cells
In : Physiopathology of the reticuloendothelial system
(HALPERN B. N. , BENACERRAF B. , DELAFESNAYE J. F. , Ed.)
Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp.12-25.
- 167) POLICARD A. , COLLET A. , PREGERMAIN S. (1957)
Electron microscopie studies on alveolar cells from mammals
In : electron microscopy.
(SJOSTRAND F. S. , RHODIN J. , Ed.)
New-York, Academic Press, pp.244-246 .
- 168) POLICARD A. , COLLET A. , MARTIN J. C. , PREGERMAIN S. ,
REUET C. (1963)
Etude infrastructurale des macrophages alvéolaires libres isolés
du poumon chez le cobaye.
C.R. Acad. Sci. , 256, 3404-3406 .
- 169) POLICARD A. CHARBONNIER J. LE BOUFFANT L. MARTIN J. C.
DANIEL-MOUSSARD H. (1968)
Vue d'ensemble sur les processus pathologiques déclenchés dans le
poumon par l'introduction de particules étrangères
Pollution atmos. , 39, 141-147 .
- 170) RANVIER L. (1890)
Les clasmatoctes .
C. R. Acad. Sci. , 110, 165-169 .
- 171) RASCHE B. , ULMER W. T. (1965)
Untersuchungen über die Herkunft der alveolar und peritoneal Makrophagen .
Med. thorac. , 22, 516-529 .
- 172) REBUCK J. W. , CROWLEY J. H. (1955)
A method of studying leukocytic functions in vivo .
Ann. Acad. Sci. , 59, 757-805 .

- 173) REBUCK J. W. , CROWLEY J. H. MONTO R. W. MONERGHAM E. A.
(1958)
Ann. N. Y. Acad. Sci. , 73, 8 .
- 174) REICHARD, ESTBORN (1951)
Metabolism of thymidine .
J. Biol. Chem. , 188, 839 .
- 175) RIIS, P. (1959)
The cytology of inflammatory exsudate .
Copenhagen, Munskgard .
- 176) ROGERS A. E. (1967)
Technique d'autoradiographie.
Amsterdam, Elsevier .
- 177) ROGERS A. E. , SHAKA J. A. , MAC DONALD A. (1961)
Regeneration of the liver absence of a "Humoral Factor" affecting
hepatic regeneration in parabiotic rats .
Amer. J. Pathol. , 39, 561-578 .
- 178) ROSER B. , (1970)
Discussion after the paper of J. G. Howard and E. Wisse .
in: Mononuclear phagocytes (VAN FURTH, Ed.)
Oxford, Blackwell .
- 179) RUSSEL R. ROSER B. (1968)
The distribution and behavior of intraveinously injected pulmonary alveolar
macrophages in the mouse .
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. , 44, 629 .
- 180) RYAN G. B. , SPECTOR W. G. (1970)
Macrophage turnover in inflamed connective tissue .
Proc. Roy. Soc. , B, 175, 1040, 269-292 .
- 181) RYLANDER R. (1968)
Pulmonary defense mechanisms to airborne bacteria .
Act. physiol. Scand. , suppl. 306, 89p.
- 182) SACQUET E. (1968)
Elevage axénique .
In: the germ-free animal in research (COATES M. E. , GORDON M. A. ,
WOSTMANN B. S., Ed.)
Londres, Academic Press.
- 183) SANDERS C. L. (1967)
Phagocytosis and translocation of ²³⁹Pu O₂ particles by peritoneal
phagocytes of the rat.
In : Diagnosis and treatment of deposited radionuclides, Richland, may
15-17, 1967 (KORNBERG M. A. , NORWOOD W. D., Ed.) Amsterdam,
Excerpta medica foundation, 1968.

- 184) SANDERS C.L. (1969)
The distribution of inhaled plutonium-239 dioxide particles within pulmonary macrophages.
Arch. environ. Health, 18, 904-912.
- 185) SANDERS C.L. BAIR W.J. (1970)
The effects of DTPA and calcium on the translocation of intraperitoneally administered $^{239}\text{Pu O}_2$ particles.
Health phys., 18, 169-173.
- 186) SAUERBRUCH F. HEYDE M. (1908)
Ueber Parabiose künstlich vereinigter Warmblüter
Münch med. Wschr., 55, 53-156.
- 187) SCHILLING V. (1943)
Das Blutbild.
Yena, G. Fischer, 1943.
- 188) SCHMALZ F., BRAUNSTEINER (1968)
On the origin of monocytes
Acta Hematol., 39, 177-182.
- 189) SCHOOLEY J.C., GIGER K. (1962)
Autoradiographic evidence for a pluripotent stem cell in bone marrow
University California Radiation Laboratory report UCRL-10683, 176-179.
- 189bis) SEDAGHAT B., MASSE R., NENOT J.C., LAFUMA J., MARTIN J.C. (1971)
Evaluation de la population totale des macrophages alvéolaires chez le rat.
C.R. Acad. Sci., 273, série D, 229-232.
- 190) SEEMANN G. (1927)
Ziegl. Beitr., vol. 79.
- 191) SEWELL W.T. (1918)
The phagocytic properties of the alveolar cells of the lung.
J. Path. Bacteriol. 22, 40-55.
- 192) SHORTER R.G., TITUS J.L., DIVERTIE M.B. (1964)
Cell turnover in the respiratory tract.
Dis. Chest., 46, 138.
- 193) SIMNETT J.D., HEPPLESTON A.G. (1966)
Cell renewal in the mouse lung. The influence of sex strain and age.
Lab. Invest., 15, 1793-1801.
- 194) SKUPINSKI W. LAFUMA J. (1967)
Über den Stoffwechsel von intravenös zugeführtem kolloidalem Cerium-144 und Beeinflussung durch DTPA.
Strahlentherapie, 134, 595-608
- 195) SLAVJANSKY K. (1869)
Experimentelle Beiträge zu Pneumokoniosen Lehre
Virchow's Arch. Pathol. Anat., 48, 326-332.

- 196) SOROKIN S. (1966)
A morphologic and cytochemical study of the great alveolar cell.
J. Histochem. cytochem., 14, 884-897.
- 197) SPECTOR W.G., WALTERS M.N.I., WILLOUGHBY D.A. (1965)
The origin of mononuclear cells in inflammatory exsudates induced by fibrinogen.
J. Path. Bacteriol., 90, 181-192.
- 198) SPECTOR W.G., STOREY E. (1958)
A factor in the oestrogen treated uterus responsible for leucocyte emigration.
J. Pathol. Bacteriol., 75, 387-398.
- 199) SPEIRS R. (1960)
Production of antibody in the reticuloendothelial system initiated by eosinophils
In : reticuloendothelial structure and function (HELLER, Ed)
New-York, Ronald Press, pp.113-142.
- 200) SPENCER H., SHORTER R.G., (1962)
Cell turnover in pulmonary tissues,
Nature, 194, 880.
- 201) SPRITZER A.A., WATSON J.A. (1964)
The measurement of ciliary clearance in the lungs of rats.
Health Phys., 10, 1093.
- 202) SPRITZER A.A., WATSON J.A., AULD J.A., GUETHHOFF M., (1968)
Pulmonary macrophages clearance : the hourly rate of transfer of pulmonary macrophages to the oropharynx of the rat.
Arch. environ. Health, 17, 726-730.
- 203) STRECKER F.J. (1965)
Tissue reaction in rat lungs after dust inhalations with special regard to bronchial dust elimination and to the dust penetration into the lung interstices and lymphatic nodes.
In : Inhaled particles and vapour, II. Cambridge 28 Sept-1 Oct. 1965 (DAVIES C. N., Ed.)
Oxford, Pergamon Press, pp.141-153.
- 204) TANAKA H., (1957)
Electron microscopic studies on the lymphatic cells in the lymph node and thymus with special reference to lymphogonia.
Acta Haemat. Jap., 20, 237-254.
- 205) TCHISTOVITCH N. (1889)
Des phénomènes de phagocytose dans les poumons.
Ann. Inst. Pasteur, 3, 337.

- 206) THOMPSON P. L. PAPDIMIRIOU J. M. WALTERS M. N. I. (1967)
Suppression of leucocytic sticking and emigration by chelation of calcium
J. Pathol. Bacteriol., 94, 389-396.
- 207) TROWELL O. A. (1965)
Lymphocytes
In : Cells and tissues in culture (WILLMER E. N., Ed.)
New-York, Academic Press, pp. 96-172.
- 208) UNGAR, J., WILSON G. R., (1935)
Monocytes as a source of alveolar phagocytes
Amer. J. Pathol., 11, 681.
- 209) VAN FURTH, R. V., COHN Z. A. (1968)
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.
J. exp. Med., 128, 415.
- 210) VAN FURTH R. V. (1970)
Origin and kinetics of monocytes and macrophages.
Seminars in hematology, 7, p. 2.
- 211) VIROLAINEN M. (1968)
Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers
in mice.
J. exp. Med., 127, 943-951.
- 212) VIROLAINEN M., DEFENDI V. (1968)
Ability of hematopoietic spleen colonies to form macrophages.
Nature, 217, 1069-1070.
- 213) VOISIN C., GUILLAUME, J., AERTS, C. (1963)
Culture in vitro de macrophages alvéolaires de cobaye. Aspects morphologiques en microcinématographie; activités phagocytaire et métabolique.
C. R. Acad. Sci., 256, 3504-3506.
- 214) VOLKMAN A., (1965)
The production of macrophages in the rat.
Brit. J. exp. Pathol., 46, 50-61.
- 215) VOLKMAN A., (1966)
The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exsudates of the rat.
J. exp. Med., 124, 241.
- 216) VOLKMAN A., GOWANS J. L., (1965)
The origin of macrophages from bone-marrow in the rat.
Brit. J. exp. Pathol., 46, 62

217) WATSON J. A. , SPRITZER A. A. , AULD J. A. , GUETHHOFF M. A.
(1969)

Deposition and clearance following inhalation and intratracheal injection
of particles

Arch. Environ. Health, 19, 15, 58.

218) WESTHUES (1922)

Ziegl. Beitr, 70, 223.

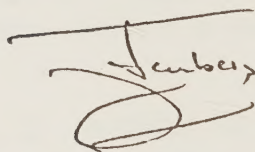
219) YERSIN A. (1888)

Etude sur le développement du tubercule expérimental.

Ann. Inst. Pasteur, 2, 246.

Manuscrit reçu le 30 août 1971

Vu et approuvé
Orsay, le 8 juin 1971
Le Vice Président du Centre d'Orsay

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "J. Dubois". The signature is stylized, with a horizontal line above the first part and a large, circular flourish at the bottom.

